

Desenvolvimento de trilaminados de pululana/celulose/zeína para embalagem alimentar

Versão final após defesa

Mariya Bilohan

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

Coorientadoras: Prof.^a Doutora Fernanda da Conceição Domingues

Prof.^a Doutora Ana Maria Matos Ramos

julho de 2021

Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação e este ano atípico gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Doutor Ângelo Luís, por me ter dado a conhecer o incrível mundo dos filmes de biopolímeros desde a licenciatura, pela orientação, por todo o conhecimento transmitido, por total disponibilidade e incansável apoio, ajuda e compreensão. Agradeço também a amizade e a preocupação demonstradas.

À Professora Doutora Ana Ramos e à Professora Doutora Fernanda Domingues, minhas coorientadoras, pelos conhecimentos transmitidos, pelo espírito científico, pelo tempo dispensado e apoio prestado.

Agradeço a possibilidade de realizar este trabalho na Unidade de Investigação Fiber Materials and Environmental Technologies (FibEnTech) e Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS).

À Doutora Ana Paula Gomes, do Centro de Ótica da Universidade da Beira Interior, pelo tempo disponibilizado para a realização dos ensaios de SEM e DSC.

À Salomé Pedro, sem a qual esta jornada não teria sido a mesma, obrigada pela amizade, apoio e paciência para comigo.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Especialmente à Luana e à Beatriz, que mesmo longe fizeram-me sentir o seu carinho e deram-me força para esta etapa, e ao Eduardo, à Miriam e à Heloisa pela sua constante presença e pela partilha de bons momentos.

Ao André por acreditar mais em mim do que eu mesma, por não me deixar desistir, pela admiração, paciência, carinho, e por ser o meu porto seguro.

E por fim, agradeço à minha família por tudo.

Bem-haja!

Resumo

A crescente preocupação com o meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de alternativas sustentáveis, principalmente na indústria de embalagens alimentares. Uma das soluções encontradas tem sido a utilização de embalagens de biopolímeros biodegradáveis, pois têm capacidade de aumentar a segurança e o tempo de prateleira do alimento embalado e contribuem positivamente para a economia circular. Contudo, os filmes de biopolímeros caracterizam-se por apresentarem fracas propriedades mecânicas e de barreira. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi produzir um trilaminado de pululana/celulose/zeína reunindo as vantagens de cada biopolímero individual e ainda, atribuir-lhe propriedades antioxidantes e antimicrobianas por incorporação do óleo essencial de esteva (OEE) (*Cistus ladanifer* L.). Assim, produziram-se filmes de zeína e pululana pelo método de evaporação do solvente. De seguida, com ajuda dos respetivos solventes, procedeu-se à produção dos trilaminados por calandragem. Foram desenvolvidos dois tipos de trilaminados: pululana/celulose/zeína (PM) e pululana/zeína/celulose (PF). A microestrutura dos trilaminados foi observada por microscopia eletrónica de varrimento e, posteriormente, os trilaminados foram caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas, óticas, de barreira, antioxidante e antimicrobiana. Por fim, os trilaminados foram empregues num modelo alimentar e a sua biodegradabilidade foi ainda avaliada. Concluiu-se que a adição da celulose melhorou as propriedades mecânicas dos trilaminados, enquanto o filme de zeína teve maior impacto nas propriedades de barreira. Já a incorporação do OEE atribuiu ao material propriedades antioxidantes e antimicrobianas, com maior efeito em bactérias Gram-positivas. Relativamente aos resultados obtidos no modelo alimentar, verificou-se que os laminados PF são mais práticos no manuseamento e mais eficazes durante o armazenamento do alimento. Tanto os laminados PM como PF demonstraram elevada biodegradabilidade.

Palavras-chave

Embalagens alimentares; Biopolímeros; Celulose; Zeína; Pululana; Óleo essencial de esteva; Laminados.

Abstract

The growing concern with the environment has led to the development of sustainable alternatives, especially in the food packaging industry. One of the solutions found was the use of biodegradable biopolymers packaging since they have the capacity to increase the safety and shelf life of the packaged food and positively contribute to the circular economy. However, biopolymer films are characterized by poor mechanical and barrier properties. Thus, the objective of this work was to produce a pullulan/cellulose/zein trilaminate combining the advantages of each individual biopolymer and to ascribe antioxidant and antimicrobial properties to the laminates with the incorporation of rockrose (*Cistus ladanifer* L.) essential oil (OEE). Thus, zein and pullulan films were produced by the casting method. Then, by using the respective solvents, the trilaminates were produced by calendering molding technique. Two types of trilaminates were developed: pullulan/cellulose/zein (PM) and pullulan/zein/cellulose (PF). The microstructure of the trilaminates was observed by scanning electron microscopy and then the trilaminates were characterized in terms of their mechanical, optical, barrier, antioxidant, and antimicrobial properties. Finally, the trilaminates were applied in a food model and their biodegradability was further evaluated. It was concluded that the addition of cellulose improved the mechanical properties of the trilaminates, while the zein film had a greater impact on the barrier properties. The incorporation of OEE ascribed antioxidant and antimicrobial properties to the material, with greater effect on Gram-positive bacteria. Regarding the results obtained in the food model, PF laminates were found to be more practical in handling and more effective during food storage. Both PM and PF laminates demonstrated high biodegradability.

Keywords

Food packaging; Biopolymers; Cellulose; Zein; Pullulan; Rockrose essential oil; Laminates.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Alternativas sustentáveis para embalagens alimentares	4
2.1 – Embalagem ativa	5
2.2 – Biopolímeros utilizados em embalagens alimentares	8
2.2.1 – Zeína	10
2.2.1.1 – Filmes de zeína	12
2.2.2 – Pululana	13
2.2.2.1 – Filmes de pululana	15
2.3 – Preparação de filmes para embalagens alimentares	16
2.3.1 – Plastificantes e emulsionantes	16
2.3.2 – Aditivos bioativos	17
2.3.2.1 – Óleo essencial de esteva (<i>Cistus ladanifer</i> L.)	18
2.4 – Tipos de filmes de biopolímeros	19
2.5 – Avaliação das propriedades físicas dos filmes	20
2.6 – Avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas	21
Capítulo 3 – Objetivos	23
Capítulo 4 – Materiais e métodos	24
4.1 – Reagentes	24
4.2 – Óleo essencial de esteva	24
4.3 – Preparação dos filmes e laminados	24
4.3.1 – Filmes de zeína	24
4.3.2 – Filmes de pululana	25
4.3.3 – Laminados	25
4.4 – Microscopia eletrônica de varrimento	26
4.5 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	26
4.6 – Calorimetria diferencial de varrimento	26
4.7 – Caracterização dos laminados	26
4.7.1 – Espessura e gramagem	26

4.7.2 – Propriedades mecânicas	27
4.7.3 – Propriedades óticas	27
4.7.4 – Propriedades de barreira	27
4.7.4.1 – Permeabilidade ao vapor de água	27
4.7.4.2 – Permeabilidade ao óleo	28
4.8 – Ângulo de contacto e energia de superfície	29
4.9 – Avaliação da atividade antioxidante	29
4.9.1 – Ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH	29
4.9.2 – Teste de branqueamento do β -caroteno	30
4.10 – Avaliação da atividade antibacteriana	30
4.10.1 – Ensaio de difusão em agar	30
4.11 – Aplicação dos laminados num modelo alimentar	31
4.12 – Ensaio de biodegradabilidade	32
4.13 – Análise estatística	32
Capítulo 5 – Resultados e Discussão	33
5.1 – Aparência dos filmes e laminados	33
5.2 – Observação microscópica da secção transversal dos laminados	33
5.3 – Espectros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos laminados	35
5.4 – Análise do comportamento térmico dos laminados	38
5.5 – Caracterização dos laminados	40
5.5.1 – Espessura, gramagem e propriedades mecânicas dos laminados	40
5.5.2 – Propriedades óticas dos laminados	42
5.5.3 – Propriedades de barreira dos laminados	43
5.6 – Propriedades de superfície dos laminados	45
5.7 – Avaliação das propriedades antioxidantes dos laminados	47
5.8 – Avaliação das propriedades antimicrobianas dos laminados	48
5.9 – Aplicação dos laminados num modelo alimentar	52
5.10 – Ensaio de biodegradabilidade dos laminados	55
Capítulo 6 – Conclusões e perspectivas futuras	57
Capítulo 7 – Referências bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1 – Categorias das embalagens inovadoras de acordo com a função desempenhada, adaptado de [21].

Figura 2 – Tipos de embalagem ativa e princípio de funcionamento, adaptado de [4], [24].

Figura 3 – Exemplos de biopolímeros utilizados nas embalagens alimentares, adaptado de [33].

Figura 4 – Modelo da estrutura secundária da zeína: aminoácidos apolares organizados em hélices empilhadas formam unidades helicoidais, enquanto nas extremidades, resíduos de glutamina interligam as unidades formadas, adaptado [39, 45].

Figura 5 – Representação esquemática do processo de produção de filmes de zeína, adaptado de [35].

Figura 6 – Estrutura química da pululana, adaptado de [57].

Figura 7 – Filme de pululana com adição de glicerol como plastificante.

Figura 8 – Flor de esteva.

Figura 9 – Aparência dos filmes de zeína (a) e de pululana (b) obtidos.

Figura 10 – Imagens de SEM da secção transversal dos laminados PM sem OEE (a), PM com OEE (b), PF sem OEE (c) e PF com OEE (d) (Ampliação 200×).

Figura 11 – Espetros de FTIR de ambas as faces dos laminados, e após o ensaio de biodegradabilidade no solo.

Figura 12 – Termogramas de DSC dos laminados PM (a) e PF (b) com e sem OEE (verde e vermelho, respetivamente).

Figura 13 – Atividade antioxidante dos laminados medida pelo ensaio de sequestração de DPPH.

Figura 14 – Caixas produzidas com os laminados PM e PF com e sem OEE em maiúsculas e minúsculas respetivamente, no início (a) e após sete dias (b).

Figura 15 – Amostras dos laminados para o ensaio de biodegradabilidade no dia 0 (a; b), na imagem (a) amostras 1,2 PM sem OEE face zeína, 3,4 PM com OEE face zeína, 5,6 PF sem OEE face pululana, 7,8 PF com OEE, na imagem (b) estão as respetivas outras faces, e a imagem (c) apresenta as mesmas amostras após 10 dias no solo.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Diferentes sistemas de embalagens ativas e seus componentes, adaptado [4, 5, 21, 25].

Tabela 2 – Gramagem, espessura e propriedades mecânicas dos laminados (média \pm desvio padrão).

Tabela 3 – Propriedades óticas dos laminados (média \pm desvio padrão).

Tabela 4 – Propriedades de barreira dos laminados (média \pm desvio padrão).

Tabela 5 – Propriedades de superfície dos laminados (média \pm desvio padrão).

Tabela 6 – Atividade antioxidante medida pelo teste de branqueamento do β -caroteno (média \pm desvio padrão).

Tabela 7 – Propriedades antimicrobianas dos laminados obtidos através do teste da difusão em agar (média \pm desvio padrão).

Tabela 8 – Imagens de microscopia ótica da atividade antibacteriana (Ampliação 100 \times).

Tabela 9 – Resultados dos testes realizados no fiambre do modelo alimentar (média \pm desvio padrão).

Tabela 10 – Perda de peso (%) dos laminados no ensaio de biodegradabilidade (média \pm desvio padrão).

Lista de Acrónimos

BHA	Butil-hidroxianisol
BHI	Brain-Heart Infusion
BHT	Butil-hidroxitolueno
DI	Diiodometano
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DPPH-H	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EA	Embalagem ativa
EG	Etilenoglicol
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização da chama (<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HR	Humidade relativa
MHA	Müeller-Hinton Agar
OE	Óleos essenciais
OEE	Óleo essencial de esteva
OWRK	Owens, Wendt, Rabel e Kaelble
PE	Polietileno
PET	Politereftalato de etileno
PF	Papel-zeína-pululana
PM	Zeína-papel-pululana
PO	Permeabilidade ao óleo

PP	Polipropileno
PP%	Perda de peso
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de vinilo
R ²	Coefficiente de correlação linear
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
T	Transparência
Tg	Temperatura de transição vítrea
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
WVP	Permeabilidade ao vapor de água (<i>Water Vapor Permeability</i>)
WVTR	Taxa de transmissão do vapor de água (<i>Water Vapor Transmission Rate</i>)

Capítulo 1 – Introdução

A evolução humana está estreitamente relacionada com as suas necessidades, por exemplo, a invenção e o desenvolvimento de embalagens alimentares ao longo da história da humanidade com o objetivo de preservar e armazenar alimentos. Inicialmente, o nomadismo não exigia ao homem ter forma de armazenar e proteger os alimentos [1]. Os povos nómadas alimentavam-se do que encontravam nas suas migrações e quando os recursos escasseavam seguiam caminho à procura de alimento, sendo a sua vida reduzida à constante procura dos recursos naturais disponíveis. Porém, ao desenvolver técnicas e utensílios de caça, o homem percebeu a importância da sobrevivência em grupo e as vantagens da vida em sociedade, instalando-se assim em comunidades e enfrentando novos desafios – um deles, e talvez o essencial, foi a necessidade de armazenar e conservar os alimentos a longo prazo [1, 2]. Recipientes de vidro e cerâmica, barris de madeira e sacos de couro são alguns dos exemplos das primeiras embalagens alimentares inventadas pelo homem séculos a.C.. Durante a primeira revolução industrial (1760 – 1840) deram-se progressos no fabrico de materiais como madeira, papel, metal e vidro, o que permitiu a sua vasta utilização para conservação de alimentos [1, 3]. Enquanto no século XX se desenvolveram materiais de embalagem mais rígidos e flexíveis, como o plástico. Nessa época ocorreu grande evolução das tecnologias de embalagem e processamento alimentar que permaneceram até aos nossos dias [1], das quais se destacam as embalagens de atmosfera modificada e sob vácuo [4].

Uma embalagem alimentar deve, primeiramente, conseguir conter no seu interior um produto/alimento, uma vez que a maioria dos alimentos necessita de uma embalagem para o transporte e/ou armazenamento [5]. Outra função importante da embalagem é a proteção, proteger o alimento a nível mecânico, isto é, de fatores externos tais como oxigénio, luz, humidade, calor, microrganismos, choques, entre outros, evitando assim a sua contaminação ou deterioração [6, 7]. A conservação do alimento é assegurada pela integridade da embalagem [5]. As embalagens também devem ser convenientes, isso aplica-se a embalagens de abertura fácil, embalagens de alimentos pré-preparados que não necessitam ser retiradas para a sua confeção, embalagens com fechos que permitem manter o alimento preservado caso não se consuma todo de uma vez ou ainda repartição de embalagens [5]. A comunicação é outra função notável de uma embalagem, esta deve vender o seu conteúdo, para além disso é de extrema importância poder comunicar com o consumidor através do produto em si. Rotular e descrever o seu conteúdo, promover o produto através de marketing silencioso, identificar o produto para tornar a sua venda e transporte mais fáceis, mesmo a nível de armazéns e distribuição são importantes funções das embalagens alimentares [3, 5].

Para além destas funções, uma embalagem deve ser inerte, isto é, o material de que é constituída não deve interagir com o alimento, ou a interação deve ser mínima [7].

Nas últimas décadas, os polímeros sintéticos à base de petróleo, como o plástico, têm sido os materiais mais utilizados para a produção de embalagens alimentares [8, 9]. Este tipo de materiais foi selecionado devido ao seu fácil manuseamento e por possuírem a capacidade de obtenção de estruturas mais flexíveis ou mais rígidas conforme o pretendido. Também é importante referir as suas boas propriedades de barreira aos gases e humidade, resistência ao impacto, boas propriedades óticas e mecânicas, baixo custo e a possibilidade de misturar diferentes polímeros sintéticos [4, 8, 10]. Face a estas características, as embalagens de plástico têm grande potencial para melhorar o armazenamento, manipulação, transporte e conservação dos alimentos. Para além disso, proporcionam um benefício económico direto ao prolongar o tempo de prateleira do alimento, reduzindo o desperdício alimentar e, com isso, o impacto ambiental da própria produção alimentar [10, 11].

Todavia, as embalagens de plástico são habitualmente mais associadas ao seu impacto negativo no meio ambiente, sendo as principais responsáveis pela poluição do meio marinho [12]. Tudo o que o torna um bom material de embalagem também o torna resistente à corrosão, e conseqüentemente, não biodegradável [10]. Assim, existe uma crescente preocupação com o volume de produção, curto tempo de utilização e problemas de descarte de resíduos de plástico que muitas vezes acabam por se acumular nos oceanos [13, 14]. Essa acumulação no meio ambiente leva à ingestão de macro- e micro-plásticos pelos organismos marinhos que posteriormente entram na cadeia alimentar de outros organismos por ingestão direta ou bioacumulação, chegando assim aos humanos [12]. A ingestão de plástico pode levar a problemas como bloqueio do trato gastrointestinal, inibição da secreção enzimática gástrica, redução dos estímulos alimentares, diminuição dos níveis de hormonas esteroides, atrasos na ovulação e incapacidade de reprodução [14]. Em 2020, pela primeira vez, foram encontrados vários fragmentos de micro-plástico na placenta humana [15], gerando uma acrescida preocupação quanto à poluição ambiental existente.

Estima-se que em 2018 foram produzidas 359 milhões de toneladas de plástico no mundo, das quais 61,8 foram produzidas pela União Europeia. 39,9% do plástico produzido na Europa destina-se a embalagens alimentares, seguindo com 19,8% para o ramo da construção e 10% para a indústria automóvel [16]. O polietileno (PE), polipropileno (PP), politereftalato de etileno (PET), policloreto de vinilo (PVC) e poliestireno (PS) são dos plásticos mais utilizados para produção de embalagens alimentares, essencialmente pelas suas ótimas propriedades de barreira e capacidade de manter o alimento fresco, protegendo-o da contaminação microbiana [13, 16].

Face ao problema descrito, têm sido propostas diversas soluções alternativas ao plástico: entre as mais simples para o consumidor - como reduzir a utilização de plástico, optar por plástico ecológico (reciclável ou biodegradável) e acondicionar devidamente o lixo [12]; até soluções mais complexas como regulamentações e programas desenvolvidos a nível governamental. A União Europeia tem vindo a introduzir o conceito de economia circular com o objetivo de atingir

um modelo mais sustentável de desenvolvimento económico. Projetos voluntários, como "Plastics 2030" da Plastics Europe, pretendem estabelecer metas e iniciativas ambiciosas para evitar a acumulação de plásticos no ambiente, aumentando a reutilização e reciclagem dos resíduos de embalagens de plástico, contribuindo assim para os benefícios da eficiência dos recursos [16]. Também a Comissão Europeia tem desenvolvido um plano de ação, focando o problema dos plásticos e do desperdício alimentar, de forma a maximizar a utilidade dos recursos e materiais, mantendo-os na economia durante o máximo de tempo possível, minimizando ao mesmo tempo o desperdício [10, 17].

Ao contrário do que acontece na abordagem linear em que os recursos são utilizados com um fim e descartados de seguida, a economia circular defende que o planeamento, o fornecimento de recursos, a aquisição, a produção e o reprocessamento são concebidos e geridos para maximizar o funcionamento do ecossistema e o bem-estar humano [10]. Outra alternativa promissora são embalagens de materiais biodegradáveis de origem natural, ou seja, recursos renováveis como os biopolímeros. Para além do benefício ecológico, as embalagens de biopolímeros biodegradáveis também podem apresentar propriedades antimicrobianas e antioxidantes de forma a valorizar o alimento.

Capítulo 2 – Alternativas sustentáveis para embalagens alimentares

Vivenciamos um tempo em que a sustentabilidade tem ganhado relevância. Ser sustentável implica capacidade de se poder restaurar ou manter e como tal a sociedade atual deve reduzir o uso de recursos não renováveis. Assim, ao nível das embalagens alimentares, têm-se desenvolvido materiais obtidos de fontes naturais, biodegradáveis e amigos do ambiente.

A embalagem alimentar já não tem apenas um papel passivo de proteção e comercialização de um produto alimentar. Atualmente, uma embalagem alimentar tem de corresponder a todos os requisitos do consumidor. A vida moderna exige alimentos naturais, práticos, prontos a comer, com o prazo de validade prolongado, seguros, em proporção adequada e benéficos para a saúde [18]. Uma embalagem alimentar inovadora é capaz de atrasar a oxidação, dificultar processos respiratórios dos alimentos, prevenir a contaminação microbiana ou a entrada de humidade, podendo ainda utilizar absorventes/emissores de CO₂, absorventes de etileno, emissores de aroma, sensores de tempo ou temperatura, indicadores de maturação, biossensores e libertar antioxidantes durante o armazenamento [7, 18–20]. Apesar dos benefícios referidos, estas embalagens ainda enfrentam muitos obstáculos, seja a nível do consumidor ou do investimento da indústria.

Dentro das embalagens inovadoras existem duas categorias distintas: embalagens ativas, que visam a proteção do alimento, e embalagens inteligentes, que se focam na comunicação, (Figura 1). Geralmente, utilizam-se combinações de sistemas inteligentes e ativos de forma a alcançar maior segurança e aumentar a validade dos alimentos, para além de comunicar sobre a sua qualidade ao longo da cadeia de distribuição e fornecimento ao consumidor final [21].

Até agora, a legislação europeia não acompanhava devidamente toda a inovação da embalagem. Em países como os Estados Unidos da América e o Japão, as embalagens ativas e inteligentes estão muito mais presentes no mercado do que nos países europeus [7], retratando assim um comportamento conservador dos consumidores europeus e resistência da parte da indústria em apostar na inovação. Estes fatores devem ser tidos em conta para um maior sucesso da implementação de embalagens alimentares inovadoras.

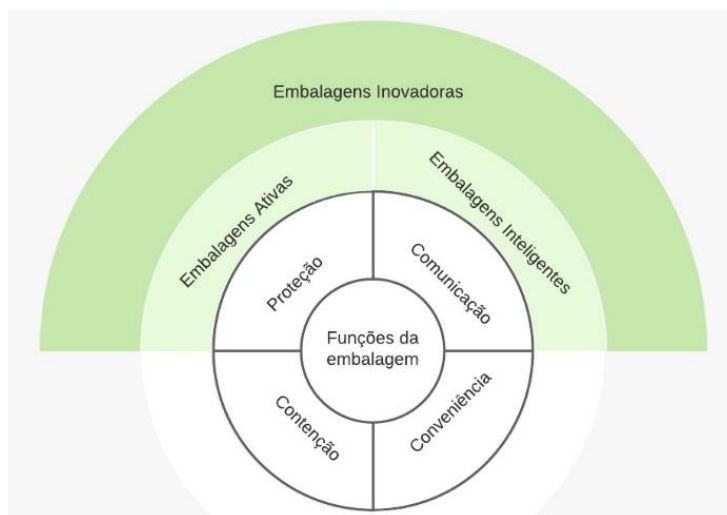


Figura 1 - Categorias das embalagens inovadoras de acordo com a função desempenhada, adaptado de [21].

2.1 – Embalagem ativa

Considera-se uma embalagem ativa (EA), uma embalagem constituída por componentes que tenham a capacidade de libertar ou absorver substâncias no interior ou exterior dos alimentos embalados ou no ambiente em seu redor, interagindo com a atmosfera interna e o alimento, de forma a prolongar a sua validade e aumentar a margem de segurança (Figura 2) [4, 19, 22]. As EA podem ser classificadas em dois grupos, conforme a sua atividade: absorventes (removem compostos indesejados como O_2 , etileno e humidade), e emissores (libertam o composto de interesse como CO_2 ou agentes antioxidantes/antimicrobianos) [4, 5]. Além disso, é possível distinguir as EA conforme o tipo de composto/aditivo que está incorporado no seu interior, podendo este ser de origem química, como permanganato de potássio para prolongar o tempo de prateleira, ou biológica, como óleos essenciais (OE) com atividade antimicrobiana [23].



Figura 2 – Tipos de embalagem ativa e princípio de funcionamento, adaptado de [4, 24].

Assim, conseguem obter-se diferentes embalagens com diversas utilidades, dependendo das propriedades ativas nelas implementadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes sistemas de embalagens ativas e seus componentes, adaptado de [4, 5, 21, 25].

Tipo de embalagem	Princípio ativo		Componente ativo	Exemplos de aplicação
Sistemas de absorção ativa	Absorventes de CO₂		Óxido de ferro; carbonato de ferro; óxido de cálcio	Fruta, vegetais, bolos, pão, biscoitos, peixe
	Absorventes de etileno		Permanganato de potássio (KMnO ₄); zeólito, argila, carvão ativado; dióxido de titânio TiO ₂	Frutas e legumes
	Absorventes de humidade		Dessecantes: argila, sílica, zeólito; bentonita; minerais ativados; sais de sódio; ácidos acrílicos	Peixes, carnes, aves, <i>snacks</i> , cereais, alimentos secos, sanduíches, frutas e vegetais
	Absorventes de sabor/odor		Triacetato de celulose; papel acetilado; ácido cítrico; ascorbato ferroso; sais ferrosos; carbono, argila, zeólito ativados	Sumos de fruta, aperitivos fritos, peixe, cereais, aves, produtos lácteos e frutas
Sistemas de emissão ativa	Antimicrobiana	Emissores de CO₂	CO ₂ ; bicarbonato de sódio	Cereais, carne, peixe, pão, queijo, fruta e vegetais
		Agentes antimicrobianos	Sintéticos: ácidos orgânicos, arginato de etilo laurílico Naturais: OE, bacteriófagos, enzimas	
	Antioxidante	Absorventes de oxigénio	Óxido de ferro; ácido ascórbico; sulfitos; enzimas	Pão, bolos, arroz cozido, bolachas, pizza, massas, queijo, carnes e peixes curados, café, <i>snacks</i> , alimentos secos e bebidas
		Sequestradores de radicais livres	Sintéticos: nanopartículas de selénio, butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA) e <i>terc</i> -butil-hidroquinona (TBHQ) Naturais: OE, extratos de plantas	

Além dos agentes ativos incorporados numa base polimérica, as propriedades ativas podem ser intrínsecas ao polímero usado na embalagem [7]. Nesse aspeto, os biopolímeros têm-se revelado promissores, para além de terem potencial para substituir os materiais derivados do petróleo, respondendo aos requisitos da sustentabilidade visto serem biodegradáveis e provenientes de fontes renováveis [19].

A absorção de humidade, o amadurecimento rápido, a oxidação e o crescimento microbiano são as quatro principais razões da deterioração alimentar [4]. Posto isto, o principal foco de uma EA é prevenir ou mesmo inibir esses processos.

A água pode acumular-se na embalagem devido a flutuações da temperatura, humidade relativa (RH) do ambiente ou ao próprio alimento, como carne/peixe fresco ou vegetais que naturalmente têm elevado teor de água na sua composição [5]. Conforme o tipo de produto alimentar, a quantidade de humidade na embalagem pode interferir com a qualidade do mesmo [24]. O controlo da humidade pode ser alcançado através de embalagens de atmosfera modificada, embalagens a vácuo ou embalagens de polímeros com boas propriedades de barreira que têm como objetivo a prevenção ou redução da humidade [4]. Existem ainda, as EA com absorventes que têm a capacidade de eliminar a humidade, por exemplo dessecantes (zeólito, argila, sílica) aplicados em saquetas, e materiais absorventes (celulose, PP, PE, folhas de PS em espuma) colocadas por baixo do produto alimentar [24].

A degradação oxidativa é uma das principais causas da deterioração dos alimentos, provocando a diminuição do valor nutritivo, aparecimento de sabor e odor desagradáveis e alteração da cor [25]. Assim, a utilização de compostos antioxidantes torna-se uma solução interessante para embalagens de alimentos com elevado teor de lípidos, como carne/peixe fresco, produtos de charcutaria e frutos secos. Os estudos demonstraram maior eficácia dos compostos antioxidantes quando incorporados nas embalagens do que quando aplicados diretamente no alimento, conseqüentemente têm-se desenvolvido embalagens à base de biopolímeros como celulose, quitosano, alginato, entre outros com incorporação de agentes antioxidantes [25]. Atualmente, agentes antioxidantes sintéticos como butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) que já foram amplamente utilizados são substituídos por compostos antioxidantes de origem natural como OE e vitamina E [5].

O crescimento microbiano é a principal causa da deterioração dos alimentos, assim uma embalagem com capacidade de retardar, reduzir ou inibir o crescimento dos microrganismos promove a segurança alimentar e aumenta o tempo de prateleira do produto [1, 4]. A deterioração dá-se do exterior para o interior, o que justifica a utilização de embalagens antimicrobianas com ação na superfície do alimento (contacto direto) ou no espaço vazio da embalagem (contacto indireto) [5]. As embalagens antimicrobianas são um tipo de EA, sendo estas divididas em duas categorias conforme a sua ação, estas podem ser migratórias, que libertam controladamente o composto antimicrobiano, e não migratórias, que atuam sem libertação do composto [26].

Os compostos antimicrobianos utilizados nestas embalagens podem ser sintéticos (por exemplo, ácidos orgânicos, antibióticos, nitritos e sais de amónio) ou de origem natural (tais como, OE, enzimas e biopolímeros) [4]. Porém, a tendência atual, devido ao crescente problema da resistência aos antibióticos, é a procura de novos compostos de origem natural com efeito antimicrobiano [4, 26].

A escolha do composto antimicrobiano depende de vários fatores, entre eles: o espectro de ação do composto (há microrganismos que proliferam mais facilmente nuns alimentos do que noutros conforme a sua composição), a segurança do composto que deve ser garantida pelas agências de segurança alimentar, a compatibilidade entre o composto e o biopolímero utilizado na embalagem e ainda, a compatibilidade entre o agente antimicrobiano e o alimento em si [4].

Assim, sistemas de EA antimicrobiana existentes incluem saquetas com compostos antimicrobianos voláteis, incorporação de agentes antimicrobianos na matriz da embalagem, aplicação do agente antimicrobiano em revestimento ou adsorção na superfície da embalagem para um contacto direto com o alimento, e utilização de biopolímeros com ação antimicrobiana intrínseca como o quitosano [26].

Diversos estudos que descrevem o desenvolvimento de EA antimicrobianas com incorporação de OE e outros compostos antimicrobianos demonstraram eficácia na atribuição de atividade antimicrobiana e antioxidante aos filmes desenvolvidos para aplicação na embalagem alimentar, tais como filmes de derivados de celulose com incorporação do resveratrol desenvolvidos por Silva *et al.* [27], filmes em bicamada de zeína e pululana com incorporação de óleo essencial de alcaçuz produzidos por Luís *et al.* [28], filmes de gelatina com nanopartículas de curcumina e enxofre estudados por Ezati e Rhim [29].

2.2 – Biopolímeros utilizados em embalagens alimentares

Um biopolímero é um material polimérico, passível de biodegradação, proveniente de fontes renováveis [13]. Existem diversas formas de classificar os biopolímeros baseadas em diferentes critérios, sendo a biodegradabilidade um dos conceitos mais importantes nessa classificação. Considera-se um material biodegradável aquele que é decomposto quando exposto a CO₂, água, metano, compostos inorgânicos ou biomassa e por ação enzimática [30]. Os biopolímeros podem ainda ser classificados consoante uma das suas três possíveis origens: biomassa, síntese química e síntese microbiana. Os biopolímeros de fontes renováveis mais frequentemente utilizados para embalagens alimentares são proteínas e polissacáridos (Figura 3).

De entre as vantagens da utilização de biopolímeros destacam-se: a biodegradabilidade, não toxicidade e elevada biocompatibilidade, o que permite a sua utilização em diversas aplicações desde a farmacologia às embalagens alimentares [31]. Como exemplo da aplicação de

biopolímeros em implantes médicos, destaca-se a seda e o quitosano [32], ou ainda, amido e subprodutos da celulose utilizados nas embalagens de cosméticos [33]. No entanto, o foco da investigação de biopolímeros mantém-se no desenvolvimento de embalagens alimentares, sendo este o setor que mais plástico utiliza e, conseqüentemente, mais contribui para a poluição do meio ambiente.

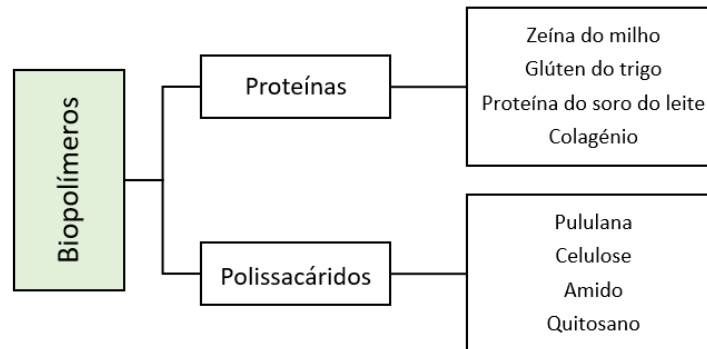


Figura 3 – Exemplos de biopolímeros utilizados nas embalagens alimentares, adaptado de [33].

Os polissacáridos são dos biopolímeros mais abundantes na natureza, não apresentam toxicidade e caracterizam-se pela sua permeabilidade seletiva. Criam boa barreira para gases, como O₂ e CO₂, mas devido à sua hidrofiliçidade, facilmente permitem a passagem do vapor de água [13, 34]. Além da hidrofiliçidade, os polissacáridos apresentam outra desvantagem, as fracas propriedades mecânicas [35, 36]. De entre os polissacáridos mais explorados destacam-se o amido e a celulose (origem vegetal) e o quitosano (origem animal) [13].

Geralmente, filmes à base de proteínas oferecem uma barreira eficiente aos vapores, gases e óleos, protegendo o alimento da deterioração biológica, prevenindo o crescimento microbiano, controlando a migração da humidade e a oxidação dos nutrientes [34]. A estrutura das proteínas permite a obtenção de filmes com melhores propriedades mecânicas do que os filmes de polissacáridos, contudo quando comparados com os polímeros sintéticos, as proteínas apresentam maior permeabilidade ao vapor de água e menor resistência mecânica [35, 37].

O principal objetivo na exploração de biopolímeros como materiais de embalagem alimentar é aliar todas as vantagens de cada um deles de forma a conseguir um material com as melhores propriedades mecânicas e de barreira possíveis [37]. Não existe um biopolímero com características ideais, no entanto, a formação de compósitos aproxima-se de um material capaz de competir com os polímeros sintéticos, mas mais amigo do ambiente.

Adicionalmente, o reaproveitamento da biomassa, proveniente do desperdício das indústrias alimentares, constitui uma mais-valia para a economia circular. Reúnem-se assim todas as condições para uma embalagem segura e amiga do ambiente. No entanto, o custo de produção e manuseamento dos biopolímeros é superior aos materiais provenientes de combustíveis fósseis [13, 37], dificultando assim a sua produção a nível industrial.

2.2.1 – Zeína

Os três cereais produzidos em maior quantidade a nível mundial são o milho (usado predominantemente na alimentação animal e na produção de bioetanol), trigo e arroz (que se destinam ao consumo humano) [38]. O milho carece de aminoácidos essenciais na sua composição, como a lisina e o triptofano [39]. Consequentemente, este cereal não beneficia a nutrição humana originando grande desperdício alimentar, já no seu aproveitamento para alimentação animal tem de ser completado com proteínas de oleaginosas ou de leguminosas [40].

O grão de milho é constituído por quatro estruturas físicas: endosperma, germe, pericarpo e ponta. O endosperma, responsável por 83% do peso seco do grão, é subdividido em vítreo e farináceo, sendo o endosperma vítreo composto maioritariamente por grânulos de amido e proteína de reserva – zeína [39]. Assim, a zeína torna-se um subproduto valioso da indústria do processamento do amido de milho.

A zeína pertence ao grupo das prolaminas, a sua composição consiste maioritariamente em aminoácidos apolares como leucina, alanina, fenilalanina e prolina, tornando-a numa proteína hidrofóbica [41]. A molécula de zeína apresenta um tamanho inferior a 230 nm e massa molecular de 10-30 kDa [42]. Existem quatro estruturas distintas da zeína: α -, β -, γ - e δ -zeína. A α -zeína é a mais abundante e é constituída por aminoácidos hidrofóbicos (leucina, alanina e prolina), a β -zeína contém aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), a γ -zeína apresenta resíduos de prolina e cisteína que permitem formação de ligações dissulfureto e a δ -zeína, para além de aminoácidos sulfurados, tem prolina e leucina [40, 43].

Ao longo dos anos, muitas teorias foram desenvolvidas para elucidar a estrutura secundária da zeína, deduzindo-se que a mesma se assemelha a um prisma cilíndrico tridimensional alongado composto por unidades helicoidais repetidas sucessivamente [40, 44] (Figura 4). Os aminoácidos apolares estão organizados em hélices empilhadas, formando as unidades helicoidais de carácter hidrofóbico, que são estabilizadas por pontes de hidrogénio e ligações dissulfureto intramoleculares [40]. Enquanto que as extremidades ricas em glutamina, proporcionam um carácter hidrofílico, interligam e empilham as unidades entre si [39, 45]. Apesar desta natureza anfipática que permite uma grande extensão da molécula e justifica o facto de ela se manter agregada em vez de monómeros separados, a hidrofobicidade prevalece devido ao elevado número de aminoácidos apolares [42, 45]. A própria estrutura tridimensional da zeína confere-lhe capacidade de resistir ao crescimento microbiano [42].

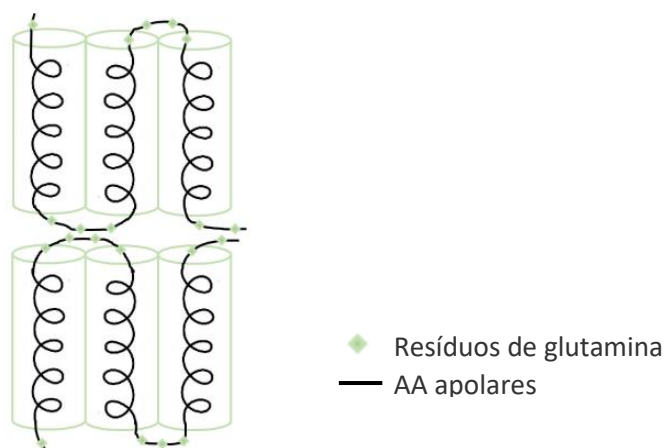


Figura 4 – Modelo da estrutura secundária da zeína: aminoácidos (AA) apolares organizados em hélices empilhadas formam unidades helicoidais, enquanto que nas extremidades, resíduos de glutamina interligam as unidades formadas, adaptado de [39, 45].

A zeína é solúvel em soluções aquosas de etanol 60-95% e soluções muito alcalinas (pH>11), porém insolúvel em água [46, 47]. A sua solubilidade varia conforme a sua estrutura maioritária, assim a α -zeína é solúvel em soluções aquosas de etanol a 75-90%, a β -zeína é solúvel em etanol a 60% e insolúvel a 95%, já a estrutura da γ -zeína apenas é solúvel em etanol por ação de um agente redutor [42]. Etanol a 50-90% é o solvente mais utilizado na solubilização de zeína, sendo possível aumentar a sua solubilidade por aumento de temperatura [43].

A extração de zeína inicialmente efetuava-se a partir da moagem a seco do grão de milho, porém verificou-se que a moagem a húmido do amido de milho tinha maior rendimento para obtenção de zeína, visto que a zeína e os grânulos de amido são o principal constituinte do germe [39]. Além do método físico de moagem, recorre-se a um método químico – precipitação da zeína por evaporação do solvente, onde se aproveita a sua solubilidade específica em soluções aquosas de etanol [43, 48]. A combinação do método químico com um método enzimático tem sido estudada como alternativa para se obter um maior rendimento do processo. O propósito final é a obtenção de zeína branca e inodora [39], porém isso implica a repetição dos procedimentos de extração, o que implicará um aumento do custo.

De entre as proteínas de origem vegetal, a zeína destaca-se por conter na sua composição resíduos de triptofano que, apesar de não satisfazerem as necessidades nutricionais humanas, atribuem-lhe uma cor amarelada em condições ácidas [42]. Assim, zeína extraída em condições ácidas possui uma cor amarelada, que se torna mais acentuada durante a preparação de filmes em soluções de etanol.

Devido à sua hidrofobicidade, solubilidade característica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, abundância, proveniência de recursos renováveis e ser geralmente reconhecida como segura (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) a zeína é considerada um

biopolímero alimentar versátil e promissor [40, 45]. Atualmente o seu custo é elevado em comparação aos polímeros sintéticos, mas acredita-se que o aumento de procura e aplicabilidade compensará essa desvantagem numa perspetiva futura [43, 45].

2.2.1.1 – Filmes de zeína

O método mais utilizado em laboratório para a preparação de filmes de biopolímeros é o da evaporação do solvente (Figura 5). Este método requer que a zeína seja dissolvida num solvente adequado, como etanol 60-95%, seguido de secagem sob condições específicas de temperatura e ventilação [49]. Durante a secagem, estabelecem-se interações hidrofóbicas e ligações de hidrogénio intramoleculares e também ligações dissulfureto intermoleculares, isto é, entre cadeias de zeína [42].

Os filmes de zeína também podem ser produzidos por processamento a seco, como extrusão a temperaturas elevadas, ou através de um conjunto de processos que inclui a aplicação de uma solução de biopolímero sobre o substrato, aceleração de fiação para dispersar o biopolímero da solução e evaporação do solvente, obtendo-se uma película [50, 51].

Um inconveniente do método mais utilizado laboratorialmente e que mais desafia os investigadores é o *scale up* para uma escala industrial, isto é, a passagem da escala laboratorial para uma escala industrial para produção de filmes [49].

A elevada polimerização da zeína permite uma boa formação de filmes, sendo a sua integridade assegurada através de interações hidrofóbicas e pontes de dissulfureto. No entanto, filmes unicamente constituídos por zeína são frágeis e quebradiços [40]. De forma a melhorar essa característica dos filmes, são acrescentados à sua composição plastificantes. As diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos plastificantes implicam múltiplos efeitos nas propriedades dos filmes. É comum a combinação de plastificantes com o intuito de se obterem filmes de biopolímeros com propriedades mecânicas, óticas e de barreira próximas às dos polímeros sintéticos [40, 41].

Os filmes de zeína possuem boas propriedades de barreira ao vapor de água e gases e a adição de glicerol e ácido oleico, como plastificantes, permite melhorar as suas propriedades mecânicas [41]. Verificou-se ainda que a zeína tem grande potencial para produzir filmes de misturas de biopolímeros e laminados [46].

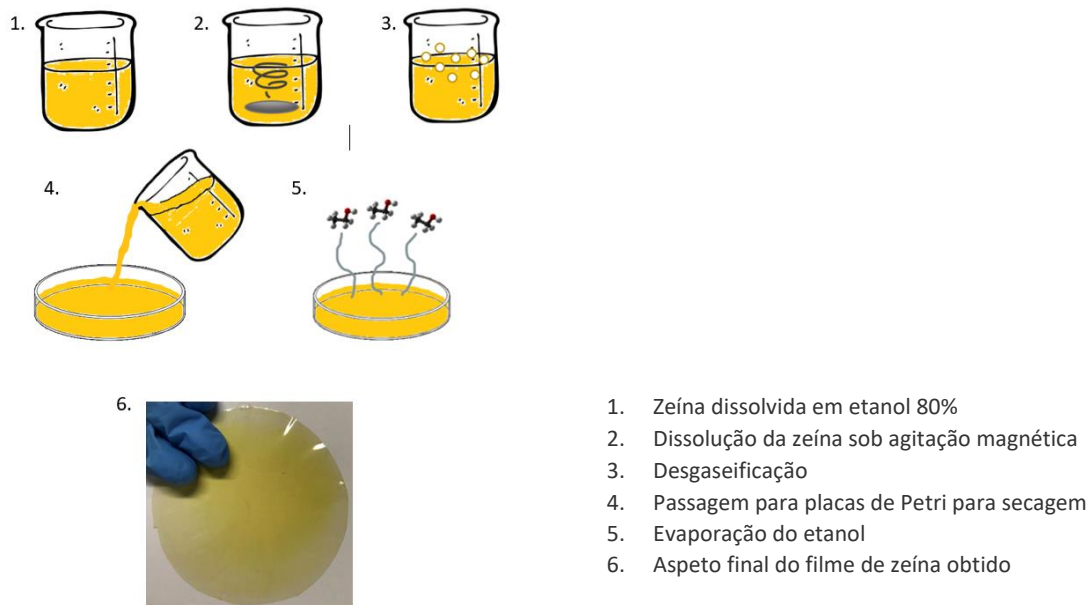


Figura 5 – Representação esquemática do processo de produção de filmes de zeína, adaptado de [35].

Devido às suas boas propriedades, os filmes de zeína podem ser utilizados tanto com aditivos, para embalagens antimicrobianas e antioxidantes, como sem aditivos, para suprimir a taxa respiratória, a germinação de sementes e o crescimento microbiano aeróbico de forma a prolongar o tempo de prateleira dos alimentos [40]. Além da área alimentar, a zeína pode ainda ser utilizada para o revestimento de comprimidos ou para entrega controlada de fármacos, essencialmente devido à sua hidrofobicidade e solubilidade em ambientes acídicos [52].

Em suma, a zeína apresenta diversas vantagens não só pelas suas propriedades, mas também por ser um subproduto valioso das indústrias. A sua utilização enquadra-se nos conceitos de sustentabilidade e de economia circular.

2.2.2 – Pululana

A pululana foi descrita pela primeira em 1958 e a sua estrutura apresentada em 1959. Há décadas que este polissacárido é utilizado no Japão como ingrediente alimentar e na indústria farmacêutica, principalmente por formar boa barreira ao O_2 [53].

A pululana é um polissacárido não iónico, linear, neutro, de massa molecular 45-600 kDa e solúvel em água, composto por unidades repetidas de maltotriose ligadas através de ligações glicosídicas α (1,6), enquanto as ligações glicosídicas α (1,4) interligam as três unidades de glucose para formar a maltotriose (Figura 6) [54–56].

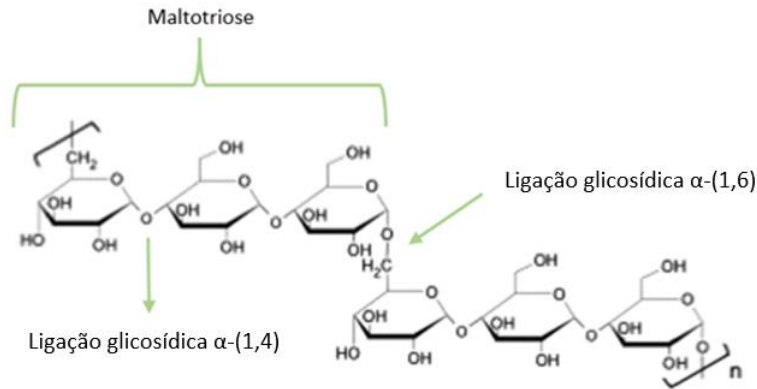


Figura 6 – Estrutura química da pululana, adaptado de [57].

Trata-se de um polissacárido de origem microbiana, produzido de forma extracelular por um fungo designado por *Aureobasidium pullulans* [58]. Para a produção de pululana utiliza-se a fermentação submersa em que o fungo necessita de fonte de carbono, azoto e outros nutrientes essenciais ao seu crescimento, exigências essas que são economicamente dispendiosas e que, conseqüentemente, tornam a produção de pululana de elevado custo [56].

Contudo, diversos subprodutos agroindustriais ricos em matéria orgânica e inorgânica, têm a capacidade de servir de fonte nutricional para o crescimento de *A. pullulans*, revelando-se assim uma alternativa economicamente vantajosa e ambientalmente benéfica para a produção deste biopolímero [53, 56]. A polpa de pele de uva, melão, resíduos de milho, resíduos de azeite, alfarroba e resíduos de coco, são alguns dos subprodutos agroindustriais utilizados em que se mostrou que o rendimento obtido era superior ou semelhante ao rendimento obtido quando utilizado o substrato convencional [53].

A pululana comercializada apresenta um aspeto de pó branco, inodoro, insípido e altamente solúvel em água. Trata-se de um polissacárido biocompatível, biodegradável, edível, não tóxico, não cancerígeno, não mutagénico, não imunogénico, e ainda, com excelente capacidade de formação de filmes [54, 59]. Além disso, a pululana é geralmente classificada como GRAS [60]. Estas propriedades destacam a pululana de outros biopolímeros e aumentam o interesse na sua utilização em diversos propósitos.

Existem diversas áreas em que a pululana tem utilidade, como por exemplo, as indústrias biomédica e farmacêutica, para entrega de fármacos no plasma, fígado e tumores, ou no revestimento de comprimidos. Na indústria alimentar, tem sido utilizada como espessante ou para encapsulamento, e ultimamente tem-se estudado a sua aplicação nas embalagens alimentares [53, 58].

2.2.2.1 – Filmes de pululana

A pululana origina filmes transparentes, incolores, finos, insípidos, inodoros, impermeáveis ao O₂, com propriedades não higroscópicas e não redutoras [54, 61]. Estas características proporcionam um acrescido interesse na sua aplicação em diversas áreas. A Figura 7 apresenta um filme de pululana com adição do glicerol como plastificante. Estes filmes possuem também algumas desvantagens que limitam a sua utilização, tais como, a sensibilidade à água, elevado custo, fracas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água [59].

De forma a melhorar as propriedades mecânicas, essencialmente a fragilidade dos filmes, é incorporado um plastificante, o glicerol, tornando os filmes mais flexíveis e resistentes mecanicamente. No caso da hidroflicidade, foram realizados estudos com cera de abelha para diminuir a permeabilidade ao vapor de água [61]. Também têm sido estudadas misturas entre polissacáridos e proteínas de maneira a formar bicamadas para contornar os inconvenientes de cada um dos biopolímeros [60].

O processo de formação de filmes de pululana é semelhante ao dos filmes de zeína. Inicialmente a pululana é dissolvida em água e adiciona-se o plastificante, sendo de seguida os filmes secos em condições de temperatura e humidade específicas [62]. Filmes de polissacáridos não são exceção e, tal como já foi referido para os filmes de proteínas, o *scale up* da sua produção é uma das dificuldades a ter de ser ultrapassada futuramente.

Os filmes de pululana têm uma ampla aplicabilidade em biomedicina, como na entrega direcionada de fármacos e também na indústria alimentar. Devido à sua impermeabilidade ao O₂, estes podem ser utilizados para evitar a oxidação de gorduras e vitaminas nos produtos alimentares. Além disso, os filmes de pululana podem ser utilizados no revestimento de alimentos impedindo a sua rápida deterioração [56, 63].

Por outro lado, podem ainda adicionar-se compostos bioativos aos filmes de biopolímeros de forma a atribuir-lhes ainda mais vantagens. Compostos naturais com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas são frequentemente incorporados. No caso dos filmes de pululana, a sua hidroflicidade não torna a incorporação de compostos hidrofóbicos, como os OE, uma tarefa fácil [61].

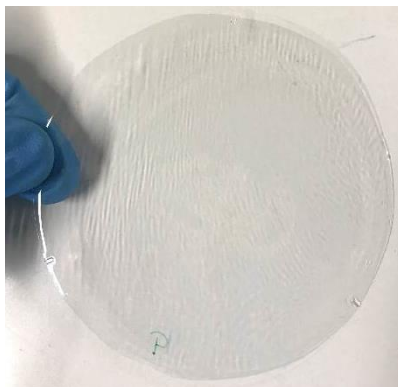


Figura 7 – Filme de pululana com adição de glicerol como plastificante.

2.3 – Preparação de filmes para embalagens alimentares

Existem diversas técnicas utilizadas na produção de filmes de polímeros sintéticos que também são aplicáveis aos filmes de biopolímeros. As técnicas, de modo geral, podem ser distinguidas entre processamento a seco e a húmido [51]. A extrusão, é um tipo de processamento a seco que se baseia nas propriedades termoplásticas dos polímeros, é a técnica que permite transformar um material do estado sólido para estado líquido através de forças de fricção, pressão e calor [30, 51]. Filmes produzidos através do método da evaporação do solvente pertencem ao processamento a húmido que consiste na dissolução dos biopolímeros num solvente apropriado sob condições de pH e temperatura específicas, sendo esta a técnica mais utilizada a nível laboratorial [51].

Os solventes mais utilizados na produção de filmes de biopolímeros que se destinam a embalagens alimentares são a água, o etanol ou uma mistura de ambos [36].

2.3.1 – Plastificantes e emulsionantes

Os filmes à base de biopolímeros, como polissacáridos e proteínas, são frágeis e quebradiços. Para melhorar esse aspeto são incorporados plastificantes na estrutura do filme. Os plastificantes são moléculas de baixo peso molecular, não voláteis, de elevada polaridade, com capacidade de se distribuírem ao longo da cadeia polimérica, sem se ligarem quimicamente a ela, e assim diminuírem as interações intermoleculares das cadeias poliméricas adjacentes [36]. Consequentemente, melhora-se a resistência, flexibilidade, elasticidade, tenacidade e diminui-se a temperatura de transição vítrea (T_g) do material [34, 36]. O glicerol, sorbitol, polietilenoglicol e ácido oleico são os plastificantes maioritariamente utilizados no filmes de biopolímeros [13]. O plastificante ideal deve ser compatível e miscível no material, ter capacidade de diminuir a sua T_g e otimizar as suas propriedades mecânicas com mínimo aumento de permeabilidade [18, 42].

Outros componentes essenciais para a formação de filmes, principalmente quando estes contêm compostos bioativos, são os emulsionantes. Os emulsionantes são compostos tensoativos com características polares e não polares, capazes de modificar a tensão superficial da interface de sistemas imiscíveis, por exemplo água-lípidos, de forma a ajudar na mistura da emulsão [5]. Métodos mecânicos como sonicação ou homogeneizadores podem ser utilizados com o mesmo intuito [23].

2.3.2 – Aditivos bioativos

Diversos compostos podem ser incorporados nas embalagens alimentares de forma a torná-las ativas e/ou inteligentes e a melhorar as suas propriedades estruturais, mecânicas e de barreira [5, 18]. As propriedades antioxidantes e antimicrobianas são as mais desejadas de se atribuir às embalagens de forma a prevenir a deterioração do alimento.

Os componentes de sabor e aroma dos alimentos podem ser alterados durante o processamento, transporte e armazenamento, devido à sua natureza volátil. Assim, a incorporação de aromatizantes naturais, como alecrim, canela, cravinho, orégãos, torna-se atrativa para melhorar os produtos alimentares [18].

O crescimento de microrganismos patogênicos são a principal causa de deterioração alimentar, o que torna os agentes antimicrobianos uma mais-valia quando incorporados nas embalagens [25]. Alguns compostos com propriedades antimicrobianas mais utilizados na indústria alimentar são ácidos orgânicos, quitosano, alguns extratos de plantas e OE [5]. É necessário ter em conta a possibilidade de interações entre compostos com atividade antimicrobiana e o biopolímero ou outros compostos presentes, pois pode haver modificações nessa propriedade e características do filme no geral. Existem diferentes modos de incorporação dos agentes antimicrobianos: inclusão de saquetas com antimicrobianos voláteis, incorporação de antimicrobianos voláteis e não voláteis diretamente na matriz do biopolímero, aplicação de antimicrobianos na superfície dos biopolímeros e a utilização de biopolímeros com atividade antimicrobiana intrínseca [26].

A degradação lipídica é outra das principais causas de deterioração alimentar, assim, compostos antioxidantes despertam grande interesse na sua incorporação em filmes para embalagens alimentares, dada a sua capacidade de sequestrar radicais livres e assim melhorar a estabilidade dos produtos alimentares suscetíveis de oxidação [25]. Os agentes antioxidantes previnem reações oxidativas que resultam em alteração da cor, sabor ou odor, alterações estruturais que se destacam por amolecimento do produto e perdas nutricionais [18]. Estes compostos podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em: primários, aqueles que reagem com radicais livres para os converter em produtos estáveis que não se envolvam em mais reações de iniciação ou propagação; e secundários, aqueles que previnem a ocorrência de reações de oxidação [25]. Aposta-se maioritariamente em agentes antioxidantes de origem natural como extratos de plantas, OE, pólen de abelhas, ácido ascórbico e cítrico [18].

Os OE são amplamente utilizados na indústria alimentar devido ao seu efeito natural antimicrobiano, antioxidante ou biopreservante, que prolonga o tempo de prateleira dos alimentos [23]. Os OE são misturas aromáticas voláteis extremamente hidrofóbicas extraídas de plantas [5, 26]. Aldeídos, fenóis e terpenoides oxigenados são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OE, devido a sua hidrofobicidade eles conseguem interagir com os lípidos da membrana celular microbiana, deixando-a mais permeável, o que leva a saída dos iões e outros constituintes celulares resultando em morte celular [26]. Os microrganismos mais

suscetíveis à ação dos OE são microrganismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus* [18].

Compostos como antocianinas, curcumina, betalaína, clorofila e caroteno são mais alguns dos exemplos de agentes bioativos incorporados nas embalagens alimentares, além das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, muitos deles são sensíveis a alterações de pH o que proporciona o seu uso para criação de EI [64].

2.3.2.1 – Óleo essencial de esteva (*Cistus ladanifer* L.)

A esteva pertence à família *Cistaceae*, género *Cistus* e espécie *Cistus ladanifer* L., (Figura 8) é um arbusto resinoso e perfumado que domina endemicamente a região mediterrânea ocidental, mais concretamente Península Ibérica, sul de França e norte de Marrocos e Argélia [65]. Caracteriza-se pela sua fácil adaptação a solos pobres e resistência a baixa exposição hídrica, alta exposição solar e incêndios, sendo por isso associada ao elevado risco de incêndios [65, 66].

A esteva tem sido alvo de vários estudos devido às suas potenciais aplicações ecológicas, aromáticas e farmacológicas, pelo seu carácter dominante, rápida colonização de áreas agrícolas queimadas, revegetação florestal, interação simbiótica e fitotóxica com o ecossistema [65].



Figura 8 – Flor da esteva.

A esteva origina uma resina aromática (lábano), que é frequentemente confundida com o óleo essencial de esteva (OEE) [66]. Tanto o lábano como o OEE são muito apreciados na indústria dos perfumes devido às suas excelentes propriedades fixadoras e aromáticas e boa interação com outras fragrâncias de diferentes famílias [67]. Normalmente, os OE são obtidos por destilação a vapor, porém no caso da esteva também tem sido utilizada a extração por CO₂ supercrítico o que origina um OE de maior pureza e qualidade, e consequentemente maior custo [68]. É de salientar que diferentes métodos de extração, solventes utilizados e plantas colhidas de localizações diferentes levam a uma composição de OE diferente, o que dificulta a comparação entre estudos realizados [65].

O OEE é maioritariamente composto por mono- e sesquiterpenos, α -pineno e viridiflorol respetivamente, o que lhe confere atividade bactericida e fungicida, além disso, foi detetado potencial antioxidante que torna interessante a sua aplicação na indústria alimentar [67, 68].

As espécies do género *Cistus*, os seus extratos e OE, são habitualmente utilizados devido às suas propriedades como anti-inflamatório, anti-ulceroso, cicatrizante, antimicrobiano, citotóxico e vasodilatador na medicina popular. Além disso, uma simples decocção das folhas destas plantas mostra efeitos antidiarreicos, antiácido e antiespasmódico [66]. São essencialmente as suas atividades antioxidante e antimicrobiana que apelam para o seu uso na indústria alimentar e de embalagem.

Numa investigação prévia realizada por Luís *et al.* [54] foram identificados os compostos do OEE por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), em modo *total ion chromatogram* (TIC), e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID), usando a percentagem de área relativa. A mesma investigação incluiu a avaliação da atividade antioxidante do OEE através do ensaio de sequestração dos radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e pelo teste de branqueamento do β -caroteno [54]. Este estudo avaliou ainda a atividade antimicrobiana contra sete espécies bacterianas: quatro Gram-positivas (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* LMG 16779, e *B. cereus* ATCC 11778), e três Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311), através do ensaio de difusão em agar, avaliação da atividade anti-*quorum sensing* e determinação dos valores da concentração mínima inibitória pelo método da resazurina [54].

A investigação de Luís *et al.* [54] concluiu que o OEE é composto maioritariamente por α -pineno (39,25%), canfeno (8,22%), trans-pinocarveol (5,48%) e acetato de bornilo (5,06%) [54]. Constatou-se que o OEE tem atividade antioxidante e capacidade para inibir a peroxidação lipídica. Além disso, possui maior atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas [54].

2.4 – Tipos de filmes de biopolímeros

De forma a melhorar as propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de biopolímeros têm sido desenvolvidas várias estratégias. Além da adição de compostos bioativos, investiga-se a possibilidade de formação de filmes em multicamada, filmes de compósitos e laminados entre biopolímeros [69]. Este tipo de materiais permite beneficiar das propriedades de cada biopolímero utilizado e contornar alguns problemas dos filmes constituídos por apenas um biopolímero.

Cada uma das três estratégias tem as suas vantagens, por exemplo, as multicamadas conseguem manter as propriedades individuais de cada biopolímero e os filmes resultantes apresentam uma estrutura heterogénea [60]. Os filmes de compósitos, que são misturas de biopolímeros com

estrutura mais homogênea, podem tirar proveito da interação dos biopolímeros [18, 70]. Já para formação de laminados recorre-se à calandragem, onde os filmes individuais são unidos com recurso à temperatura e pressão [71].

Outra abordagem interessante é a combinação de filmes de biopolímeros com o papel, dado estes materiais serem ambos biodegradáveis, recicláveis e serem provenientes de fontes renováveis. Os biopolímeros apresentam boas propriedades de barreira mas fracas propriedades mecânicas, já o papel, pelo contrário, é muito poroso mas tem excelentes propriedades mecânicas [69, 71].

Filmes de polissacáridos que apresentam fracas propriedades mecânicas e elevada hidrofiliabilidade podem ser melhorados com a produção de filmes em multicamada de diferentes materiais ou com a adição de lípidos hidrofóbicos [35, 36].

Os lípidos não têm capacidade para formar filmes por si só, conseqüentemente são incorporados em filmes de polissacáridos ou proteínas. A adição de compostos lipídicos mais simples, como cera de abelha e parafina, demonstram melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes [36, 72].

Já foram desenvolvidos filmes em bicamada de pululana-zeína, compensando a hidrofiliabilidade de um com a hidrofobicidade do outro [60], ou ainda, compósitos de pululana e quitosano, juntando as propriedades antimicrobianas naturais do quitosano com a ótima capacidade de formação de filmes da pululana [73], e também já foram produzidos laminados de xilanas e papel com melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos materiais resultantes [71].

2.5 – Avaliação das propriedades físicas dos filmes

Uma embalagem alimentar deve assegurar a proteção do alimento embalado, para isso o material de que é feita deve ser caracterizado, especialmente ao nível das propriedades mecânicas, de superfície, de cor e de barreira [74].

As propriedades mecânicas são responsáveis pela resistência ao impacto do material, sendo avaliados parâmetros como o alongamento à rutura, índice de tração e módulo elástico. O alongamento à rutura corresponde à razão entre o comprimento obtido no momento antecedente à rutura e o tamanho inicial da amostra e é expresso em percentagem [75]. O índice de tração está correlacionado com a resistência à tração, isto é, a força máxima aplicada numa amostra antes da rutura por unidade de largura da amostra (N.m/g). Assim, o índice de tração corresponde à razão entre a resistência à tração e a gramagem da amostra [76]. O módulo elástico indica a rigidez do material, isto é, a capacidade de resistência à mudança de comprimento/forma quando o material é submetido a uma força e calcula-se a partir da razão entre a tensão de rutura e a deformação (MPa) [77].

A superfície de um material de embalagem é avaliada quanto à hidrofobicidade através da medição do ângulo de contacto que posteriormente permite calcular as energias livres de superfície do material através do método de Owens, Wendt, Rabel e Kaelble (OWRK). A energia de superfície é uma medida termodinâmica que descreve o estado de equilíbrio dos átomos na camada superficial de um material e é característica de cada substância [78]. Ao contrário dos átomos do interior do material, os átomos da superfície têm um conjunto de interações incompleto e desequilibrado, o que leva a terem mais energia [79]. Uma superfície tende sempre a minimizar a sua energia, assim define-se energia de superfície como a energia necessária por unidade de área para aumentar o tamanho da superfície e expressa-se em mN/m [80].

A cor e as propriedades de barreira são também reconhecidas como importantes indicadores de desempenho de um material de embalagem em termos de aparência geral, aceitação do consumidor e gama de utilização [74]. O sistema de cor CIE $L^*a^*b^*$ permite apresentar numericamente as cores correlacionando consistentemente os valores de cor com a percepção visual. Neste sistema, o L^* representa a luminosidade e varia entre 0 (preto) e 100 (branco), enquanto a^* e b^* são coordenadas cromáticas em que é representada a variação de $+a^*$ (vermelho) a $-a^*$ (verde) e $+b^*$ (amarelo) a $-b^*$ (azul) [81]. A transparência é outro fator relevante para a satisfação do consumidor. As propriedades de barreira são geralmente avaliadas para o vapor de água, O_2 e óleo, sendo que estas propriedades dependem diretamente das propriedades mecânicas dos materiais, por exemplo a permeabilidade das amostras aumenta com a diminuição da sua espessura ou com a incorporação de compostos bioativos [82].

2.6 – Avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas

Entre os métodos *in vitro* existentes para avaliação das propriedades antioxidantes destacam-se o ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH, baseado em reações de redução, e o teste de branqueamento do β -caroteno, associado à peroxidação lipídica [83]. O ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH avalia a capacidade de uma substância em sequestrar o radical livre DPPH, reduzindo-o a hidrazina (DPPH-H) ocorrendo uma alteração de cor da solução de violeta para amarelo. Assim, a atividade antioxidante é monitorizada através da diminuição da absorvência, na gama de comprimento de onda entre 515 e 520 nm, medida num espectrofotómetro [84]. O teste de branqueamento do β -caroteno é um método competitivo direto em que numa emulsão de β -caroteno com ácido linoleico em água saturada com O_2 , através do aumento de temperatura se geram radicais hidroperóxidos, provenientes da degradação oxidativa do ácido linoleico, que atacam a molécula do β -caroteno provocando a sua descoloração, a presença de compostos antioxidantes irá impedir que isso ocorra [85].

Para avaliar as propriedades antimicrobianas, o ensaio de difusão em agar é dos métodos mais usados. Este ensaio consiste em inocular placas contendo meio de cultura agarizado com um inóculo padronizado, de seguida são colocados na placa discos das amostras, com cerca de 6 mm de diâmetro, podendo ser a amostra em si ou um disco de celulose com a amostra teste impregnada, e as placas são incubadas em condições adequadas [86]. O composto antimicrobiano difunde-se pela superfície do meio de cultura, inibindo o crescimento microbiano, formando um halo de inibição à volta do disco, caso a atividade não seja suficiente para formar o halo pode, ainda, haver inibição por contacto no caso de ensaios com amostras de filmes [86].

Capítulo 3 – Objetivos

A crescente utilização de polímeros sintéticos nas embalagens alimentares e o seu posterior incorreto descarte tem levado a graves preocupações ambientais, essencialmente pela resistência que estes materiais apresentam à degradação. O desenvolvimento de filmes de biopolímeros com adição de compostos ativos surge como uma alternativa sustentável às embalagens de plástico, contribuindo ainda para a diminuição do desperdício alimentar ao prolongar o tempo de prateleira dos alimentos e apoia o conceito de economia circular dado o reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Neste contexto, no presente trabalho desenvolveram-se trilaminados (zeína, pululana, papel) com incorporação de óleo essencial de esteva para produzir uma embalagem alimentar ativa. Assim, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Produção de filmes individuais de zeína e de pululana com e sem incorporação de OEE;
2. Produção por calandragem de dois tipos de laminados (papel-zeína-pululana e zeína-papel-pululana);
3. Análise da secção transversal dos laminados através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM - *Scanning Electron Microscopy*) e caracterização dos laminados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
4. Análise do comportamento térmico dos laminados através da calorimetria diferencial de varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*);
5. Caracterização dos laminados quanto à espessura, gramagem, propriedades mecânicas, óticas e de barreira;
6. Determinação dos ângulos de contacto e das energias de superfícies dos laminados;
7. Avaliação das propriedades antioxidantes dos laminados;
8. Avaliação da atividade antimicrobiana dos laminados contra alguns patógenos alimentares;
9. Aplicação dos laminados num modelo alimentar utilizando fiambre fresco;
10. Realização de ensaios de biodegradabilidade no solo.

Capítulo 4 – Materiais e métodos

4.1 – Reagentes

O OEE (*Cistus ladanifer* L., *Cistaceae*) foi adquirido na Herdade de Vale Côvo (Parque Natural do Vale do Guadiana, Serra de Mértola, Alentejo, Portugal). A pululana (CAS: 9057-02-7), massa molar 574,57 g/mol foi adquirida na TCI Europe NV. A zeína (CAS: 9010-66-6), peso molecular 22-24 kDa foi adquirida na Sigma-Aldrich. O glicerol (anidro, extra puro) (CAS: 56-81-5) e o ácido oleico (CAS: 112-80-1) foram adquiridos na Merck.

4.2 – Óleo essencial de esteva

O OEE foi isolado a partir das partes aéreas do arbusto, mais especificamente das suas folhas, que cresce espontaneamente no campo (agricultura biológica, PT-BIO-02, ECOCERT, Portugal) sendo colhido à mão com uma foice. A extração foi feita num alambique de aço inoxidável através da destilação a vapor de água [87].

4.3 – Preparação dos filmes e laminados

Os filmes de zeína e de pululana foram preparados pelo método de evaporação do solvente (*casting method*) e os laminados foram produzidos por um método de calandragem.

4.3.1 – Filmes de zeína

Para a preparação dos filmes de zeína, foi preparada uma solução (10%, p/v) de zeína em pó dissolvida em etanol (80%, v/v) sob agitação magnética (300 rpm) à temperatura ambiente durante 5 min. De seguida, foi adicionada como plastificante uma mistura de glicerol/ácido oleico (3:1) (25%, p/p relativamente à zeína) misturando-se a solução a 60°C durante 30 min sob agitação (300 rpm). De modo a eliminar algum ar incluso, a solução foi colocada sob vácuo durante alguns segundos e distribuída uniformemente (cerca de 5,5 mL/placa) em placas de Petri de poliestireno. Por fim, as placas foram colocadas numa estufa ventilada a 60°C durante aproximadamente 1 h. Após a secagem, os filmes foram destacados das placas e armazenados à temperatura de 23±2°C e humidade relativa (HR) de 50±5% [46].

4.3.2 – Filmes de pululana

Inicialmente, a solução aquosa de pululana (3%, p/v) foi preparada sob agitação magnética (300 rpm) à temperatura ambiente durante 5 min. De seguida, foi adicionado o glicerol como plastificante (15%, p/p relativamente à pululana) e procedeu-se à agitação da solução à temperatura de 50°C durante 30 min. O OEE (15%, p/p relativamente à pululana) foi adicionado à solução e seguiu-se uma agitação sob as mesmas condições durante 10 min. Por fim, a solução foi homogeneizada com dois ciclos de 4 min a 7600 rpm e 12000 rpm utilizando um homogeneizador com rotor-estator IKA T25 Digital Ultra-Turrax. A solução foi distribuída em placas de Petri de poliestireno (cerca de 16 mL/placa) que foram posteriormente colocadas em estufa ventilada a 60°C durante cerca de 3 h. Os filmes controlo (sem adição do OEE) foram preparados de modo similar excluindo-se a etapa da adição do OEE e posterior homogeneização. Após a secagem, os filmes foram destacados das placas e armazenados à temperatura de 23±2°C e HR de 50±5% [54].

4.3.3 – Laminados

Os laminados foram produzidos a partir de três materiais: filmes de pululana com e sem OEE, filmes de zeína e papel industrial de impressão e escrita de 80 g/m² em duas sequências diferentes: zeína/papel/pululana (PM) e papel/zeína/pululana (PF).

Inicialmente produziram-se laminados com filmes de zeína e papel, utilizando primeiramente um processo químico e depois um processo mecânico. Para promover ligações químicas e físicas recorreu-se ao solvente anteriormente utilizado na preparação dos filmes de zeína, tendo sido, para isso, o papel humidificado uniformemente com etanol a 80% (v/v). De seguida, colocou-se por cima um filme de zeína, sendo este conjunto calandrado entre o rolo duro (*hard*) de aço inoxidável e o rolo macio (*soft*) de algodão, utilizando uma calandra Beloit Wheelles, Modelo 703, sob condições constantes de temperatura (100°C no rolo aquecido), pressão de 17 bar e velocidade 1 m/min. Após uma breve secagem do etanol, seguiu-se a adesão do filme de pululana ao laminado. Assim, conforme a sequência pretendida, humidificou-se o lado da zeína (para obter o laminado PF) ou o lado do papel (para obter o laminado PM) com água destilada e colocou-se por cima o filme de pululana controlo ou o filme de pululana com OEE. De seguida, o conjunto foi calandrado novamente sob as mesmas condições, com o cuidado de colocar o conjunto com a pululana contra o rolo macio. Depois de secos à temperatura ambiente, os laminados foram armazenados à temperatura de 23±2°C e HR de 50±5% [71].

4.4 – Microscopia eletrónica de varrimento

De forma a visualizar secção transversal dos laminados recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento. Utilizou-se o microscópio eletrónico de varrimento SEM Hitachi S-2700, voltagem igual a 20,0 kV. As amostras foram preparadas com a ajuda de uma lâmina afiada e tiras finas foram fixas num suporte próprio com cola de carbono sendo posteriormente revestidas com ouro num evaporador de metais Quorum Q150R (East Sussex, UK) [60].

4.5 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR de ambos os lados dos laminados foram obtidos no intervalo de 4000 e 600 cm^{-1} utilizando o equipamento Nicolet iS10 smart iTRBasic com 120 varrimentos e a resolução de 4 cm^{-1} [60].

4.6 – Calorimetria diferencial de varrimento

O comportamento térmico dos laminados foi analisado por calorimetria diferencial de varrimento utilizando o calorímetro Netzsch DSC 204. As amostras foram previamente secas a 105°C durante 24h. Inicialmente foram obtidas linhas de base para todas as amostras. O ensaio realizou-se entre a temperatura ambiente e 350°C com uma taxa de aquecimento de 5°C/min e uma atmosfera inerte [54].

4.7 – Caracterização dos laminados

4.7.1 – Espessura e gramagem

A espessura dos laminados foi medida em cinco posições aleatórias de cada amostra de acordo com a norma ISO 534:2011 utilizando um micrómetro Adamel Lhomargy, modelo MI 20 com uma sensibilidade de 0,001 mm.

Para determinar a gramagem de acordo com a norma ISO 536:1995, os laminados foram pesados numa balança analítica com precisão de $\pm 0,001$ g. A gramagem calculou-se de acordo com a equação (1) [60]:

$$\text{Gramagem} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{área (m}^2\text{)}} \quad (1)$$

4.7.2 – Propriedades mecânicas

Para avaliar a resistência dos laminados foram determinadas as suas propriedades mecânicas através de ensaios de tração realizados no equipamento Thwing-Albert Instrument Co., com uma célula de carga de 500 N que permite aplicar uma carga uniaxial nas amostras. Analisaram-se o alongamento à ruptura (%), o índice de tração (N.m/g) e o módulo elástico (MPa). Seguiu-se a norma ISO 1924/2 alterando a distância inicial da garra para 50 mm e a velocidade de teste para 10 mm/min. foram submetidas ao teste 3 amostras de laminados com as seguintes medidas: 1,5 × 8 cm.

4.7.3 – Propriedades óticas

Para avaliação das propriedades óticas dos laminados, como a cor e a transparência, foi utilizado um espectrofotômetro Technidyne Color Touch 2. Realizaram-se várias medições aleatórias em ambos os lados de cada amostra, utilizando o iluminante D65 (luz do dia com componente ultravioleta) e o ângulo de observação 10°. A transparência (T) das amostras foi calculada de acordo com a equação (2) definida pela norma ISO 22891 [28]:

$$T = \sqrt{(R_W - R_0) \left[\frac{10000}{R_{(w)}} - R_0 \right]} \quad (2)$$

em que, R_W é a refletância da amostra em % quando posicionada sobre um fundo branco, R_0 é a refletância da amostra sobre um fundo negro e $R_{(w)} = 90.41$ é a refletância do fundo branco padrão utilizado no ensaio.

4.7.4 – Propriedades de barreira

4.7.4.1 – Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (WVP – *Water Vapor Permeability*) (g/Pa.dia.m) e a taxa de transmissão de vapor de água (WVTR – *Water Vapor Transmission Rate*) (g/m².dia) foram determinadas de acordo com a norma ASTM E96-00. Em caixas próprias para o ensaio foram colocadas 15 g de cloreto de cálcio (CaCl₂) anidro, previamente seco a 105°C. De seguida, as amostras dos laminados foram fixadas de forma que o lado da zeína ou do papel das amostras PM ou PF, respetivamente, estivesse em contacto com o exterior da caixa expostos à

temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e HR de $50 \pm 5\%$, enquanto o lado da pululana ficou em contacto com o interior da caixa sob 0% de HR e mesma temperatura. Os ensaios foram realizados em duplicado com uma área de amostra exposta de $38,48 \text{ cm}^2$ e foram efetuadas pesagens a cada 2 h durante 48 h. WVTR foi calculada de acordo com a equação (3):

$$WVTR = \frac{\Delta m}{\frac{\Delta t}{A}} \quad (3)$$

em que Δm é a variação de peso da caixa com a amostra (g), A é a área de amostra exposta (m^2) e Δt é a variação do tempo de ensaio (dia), $\Delta m/\Delta t$ (g/dia) é o declive obtido a partir de uma regressão linear entre a variação de peso em função do tempo. WVP foi calculada de acordo com a equação (4):

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta p} = \frac{WVTR}{p(HR_1 - HR_2)} \times e \quad (4)$$

em que $p=2643,38 \text{ Pa}$ corresponde à pressão de vapor da água a 22°C , HR_1 e HR_2 são, respetivamente, a HR no exterior (50%) e interior (0%) da caixa, e é a espessura (m) das amostras [88].

4.7.4.2 – Permeabilidade ao óleo

As amostras foram testadas quanto à sua permeabilidade ao óleo. Prepararam-se tubos de ensaio com 5 mL de óleo de girassol alimentar selados com os diferentes laminados. De seguida, os tubos foram invertidos e colocados em contacto direto com papel de filtro previamente seco a 105°C durante 24 h e pesado. Após as 24 h do ensaio, o papel de filtro voltou a ser pesado. A permeabilidade ao óleo (PO) ($\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}$) foi calculada de acordo com a equação (5):

$$PO = \frac{\Delta W \times e}{A \times t} \quad (5)$$

em que ΔW corresponde à diferença de peso do papel de filtro (g), e é a espessura das amostras (mm), A é a área de contacto entre amostra e papel de filtro (m^2) e t é o tempo do ensaio (dias) [88].

4.8 – Ângulo de contacto e energia de superfície

O ângulo de contacto corresponde ao ângulo interno da gota formado entre o líquido, a amostra e o ar, traçando-se uma reta tangente ao ponto trifásico (líquido-sólido-gasoso). A medição do ângulo de contacto permite avaliar a hidrofobicidade da superfície das amostras. Neste ensaio foram utilizados três líquidos: água (polar), etilenoglicol (EG) (anfifílico) e diiodometano (DI) (apolar). Aplicou-se o método da gota séssil utilizando o instrumento de medição SCA20_U DataPhysics em que uma seringa foi previamente cheia com o líquido de referência e uma gota de 4 µL (água e EG) ou de 2 µL (DI), foi deixada cair livremente sobre a amostra, gravando-se simultaneamente um vídeo com a câmara IDS. Para cada lado da amostra foram realizadas pelo menos 4 medições e foram calculados os valores médios. As componentes polar e dispersiva da energia de superfície dos líquidos de referência foram fornecidas pelo software do equipamento.

4.9 – Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos laminados foi realizada através de dois métodos previamente implementados: ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH e teste de branqueamento do β-caroteno [28].

4.9.1 – Ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH

Inicialmente preparou-se uma solução metanólica de DPPH (0,1 mM). O controlo foi composto por 0,1 mL de metanol e 2,9 mL da solução de DPPH e o metanol foi utilizado como branco. Foram adicionados 3 discos (6 mm de diâmetro) de cada laminado em tubos de ensaio contendo 2,9 mL da solução de DPPH. De seguida, foram medidas as absorvências a 517 nm num espectrofotómetro a cada 30 min durante 5 h e os ensaios foram realizados em duplicado. A percentagem de inibição foi calculada através da equação (6) [28, 54, 88]:

$$\%Inibição = \frac{A_{controlo} - A_{amostra}}{A_{controlo}} \times 100 \quad (6)$$

onde o $A_{controlo}$ é a absorvência do controlo e $A_{amostra}$ é a absorvência da mistura reacional na presença das amostras dos diferentes laminados [88].

4.9.2 – Teste de branqueamento do β -caroteno

Inicialmente, 50 μ L de uma solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) foram adicionados a 40 μ L de ácido linoleico, 400 μ L de Tween 40 e 1 mL de clorofórmio, sendo esta mistura homogeneizada. De seguida, o clorofórmio foi evaporado sob vácuo e foram adicionados 100 mL de água destilada saturada com oxigénio para formar uma emulsão homogénea. O branco para leitura das absorvências foi preparado à semelhança da emulsão anterior, substituindo os 50 μ L da solução de β -caroteno por 50 μ L de clorofórmio. O controlo consistiu em 5 mL da emulsão com β -caroteno e 300 μ L de metanol. Posteriormente, 5 mL da emulsão com β -caroteno foram pipetados para tubos de ensaio com 3 discos de cada laminado (6 mm de diâmetro). Por fim, os tubos foram agitados e colocados a 50°C num banho durante 1 h. As absorvências das amostras a 470 nm foram lidas no momento inicial, antes da incubação ($t=0$ h), e no final da incubação ($t=1$ h). Este teste foi realizado em triplicado. A atividade antioxidante dos laminados foi determinada como percentagem de inibição da oxidação do β -caroteno pela equação (7) [54, 88]:

$$\%Inibição = \frac{A_{amostra}^{t=1 h} - A_{controlo}^{t=1 h}}{A_{controlo}^{t=0 h} - A_{controlo}^{t=1 h}} \times 100 \quad (7)$$

onde $A^{t=1 h}$ é a absorvência das amostras ou do controlo após incubação e $A^{t=0 h}$ é a absorvência do controlo no momento inicial antes da incubação.

4.10 – Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos laminados foi avaliada contra sete espécies bacterianas: quatro Gram-positivas (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* LMG 16779, e *B. cereus* ATCC 11778), e três Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, e *S. Typhimurium* ATCC 13311). As culturas bacterianas foram preparadas e conservadas com 20% (v/v) de glicerol à temperatura de -80°C. Todas as estirpes foram inoculadas em meio BHI (*Brain-Heart Infusion*) nas 24 h antecedentes aos ensaios antibacterianos [54].

4.10.1 – Ensaio de difusão em agar

Para o ensaio de difusão em agar, foram preparados inóculos através da suspensão de algumas colónias bacterianas em solução salina estéril (NaCl, 0,85, m/v), de forma a obter-se uma suspensão bacteriana correspondente a 0,5 unidades de McFarland ($1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias/mL (UFC/mL)). De seguida, as placas contendo Müeller-Hinton agar (MHA) e as placas de BHI (para as espécies *L. monocytogenes* e *E faecalis*) foram inoculadas

mergulhando-se uma zaragatoa estéril nas suspensões bacterianas previamente preparadas, girando algumas vezes, e eliminando o excesso. De seguida, esfregou-se a zaragatoa em toda a superfície do agar em três direções diferentes, rodando as placas de Petri 60° de cada vez, contornando-se, por fim, a placa de modo a uniformizar a inoculação. Os discos das diferentes amostras de laminados (6 mm de diâmetro) foram colocados na superfície das placas inoculadas e pressionados levemente, sempre de forma que o lado de pululana ficasse em contacto direto com o agar. Por fim, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. O ensaio foi realizado em triplicados independentes. Após a incubação, as placas foram verificadas visualmente quanto a zonas de inibição, tendo sido medidos os diâmetros dos halos de inibição com a ajuda de um paquímetro digital. As placas foram ainda observadas ao microscópio ótico Nikon Labophot-2 com a câmara Leica MC190 HD, para confirmar a inibição do crescimento microbiano [88].

4.11 – Aplicação dos laminados num modelo alimentar

A eficácia dos laminados aplicados como material de embalagem alimentar foi estudada através de um modelo alimentar, fatias de fiambre fresco, adaptando o protocolo descrito por Küçüközet *et al.* [89].

Foram preparados protótipos de caixas dos dois tipos de laminados, nas quais foram colocadas cinco fatias de fiambre da perna extra (5 × 7 cm, espessura de 1 mm). As caixas com as amostras foram armazenadas a 4°C durante 7 dias. Como controlo prepararam-se e armazenaram-se nas mesmas condições, amostras de fiambre embaladas em plástico. Foi determinada a cor do fiambre, do mesmo modo descrito no ponto 4.7.3 e mediu-se a massa das amostras no momento inicial e no final do ensaio. A perda de peso (PP%) das fatias de fiambre calculou-se a partir da equação (8) [88]:

$$PP(\%) = \frac{M_{inicial} - M_{final}}{M_{inicial}} \times 100 \quad (8)$$

onde $M_{inicial}$ corresponde à massa das amostras no momento inicial e M_{final} a massa após os 7 dias.

Além disso, analisou-se a textura do fiambre através do teste de compressão realizado no texturómetro DOP_Texture Analyser-CICS2020_VO2 com uma sonda P10. Foi definida uma força de 0,049 N e a velocidade: pré-teste 1 mm/s, teste 2 mm/s e pós-teste 10 mm/s com uma distância inicial da sonda à amostra de 3 cm. O teste de compressão consiste na aplicação de uma força compressiva de forma a obter-se a força de deformação (N) – força máxima necessária para uma pré-deformação, e a energia de deformação (N.mm) que corresponde à área abaixo da curva obtida através do gráfico da força em função do deslocamento [89, 90].

4.12 – Ensaio de biodegradabilidade

Para avaliar a biodegradabilidade dos laminados foi realizado o ensaio da degradação por enterramento no solo. Foram preparadas tiras dos laminados (1,5 × 8 cm) que foram posteriormente enterradas em solo orgânico a uma profundidade de 10 cm, durante 10 dias. As amostras foram mantidas a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e HR de $50 \pm 5\%$. Após esse período, as amostras foram retiradas, limpas com água destilada e secas num exsiccador durante 48 h. No final dos ensaios foi calculada a perda de peso segundo a equação (8). Foram ainda obtidos os espectros de FTIR segundo descrito na secção 4.5 [88].

4.13 – Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados utilizando o Microsoft Excel® pelo teste *t* de *Student* com um intervalo de confiança de 95%, assumindo a distribuição normal das variáveis contínuas, considerando-se diferenças com significado estatístico quando *p-value* $< 0,05$.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.1 – Aparência dos filmes e laminados

Inicialmente, neste trabalho foram produzidos filmes de zeína e de pululana (com e sem OEE). No caso dos filmes de zeína (Figura 9a) obtiveram-se filmes translúcidos, homogêneos, flexíveis, com uma superfície lisa e de cor amarela (que se deve aos resíduos de triptofano presentes na proteína [42]). Já os filmes de pululana (Figura 9b) são transparentes, homogêneos, flexíveis e com superfície lisa. Os filmes de pululana com incorporação do OEE mantêm as características dos filmes sem OEE, porém apresentam uma ligeira turbidez e o odor característico do OEE que tende a desvanecer-se com o tempo.

Os laminados foram produzidos com papel de pasta de eucalipto sem qualquer tratamento adicional, obtendo-se trilaminados opacos, pouco flexíveis, com cor amarela (nos laminados PM correspondente ao lado do filme de zeína ou no caso de laminados PF dado a pululana ser transparente) e branca (nos laminados PF correspondente ao lado do papel e nos laminados PM deve-se, mais uma vez, à transparência da pululana).

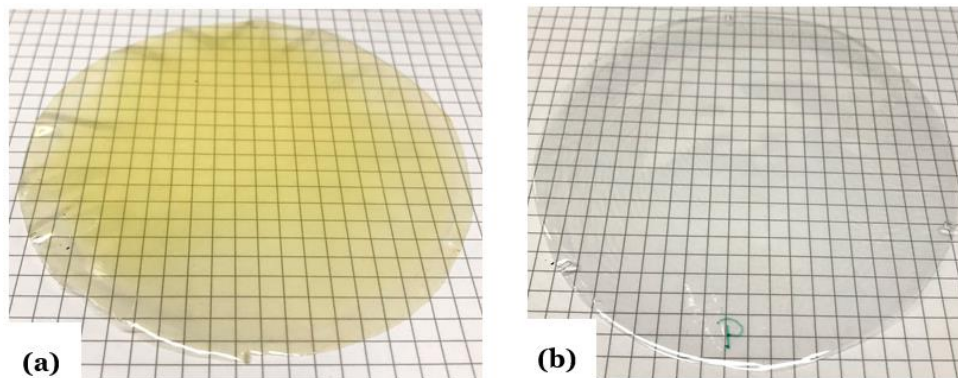


Figura 9 - Aparência dos filmes de zeína (a) e pululana (b) obtidos.

5.2 – Observação microscópica da secção transversal dos laminados

A microscopia eletrônica de varrimento é geralmente utilizada para estudar a morfologia da superfície de materiais poliméricos [91]. Em casos de materiais em multicamada é importante visualizar a microestrutura da sua secção transversal para garantir a união das diferentes camadas. Um ponto importante é a humidificação uniforme da superfície dos filmes pelos respectivos solventes antes da calandragem, processo que promove a formação de pontes de

hidrogénio, fulcrais para uma boa união das camadas de modo a evitar a sua posterior separação [71]. Na Figura 10 estão apresentadas as imagens de SEM da secção transversal dos laminados.

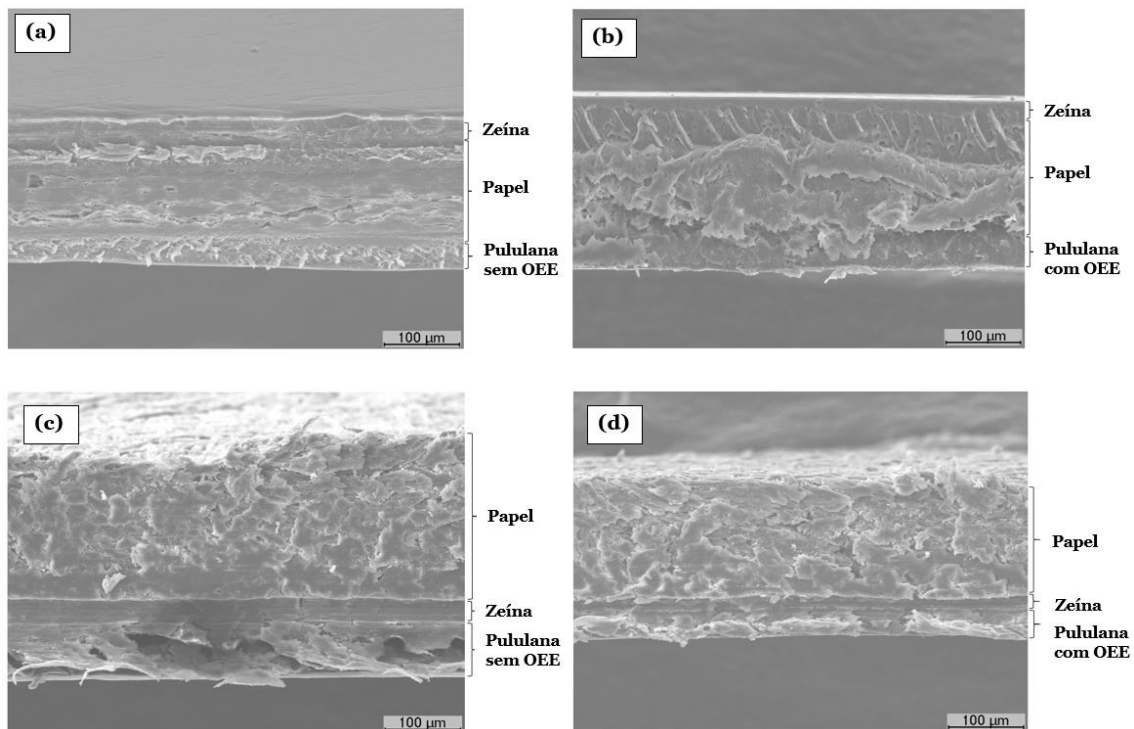


Figura 10 – Imagens de SEM da secção transversal dos laminados PM sem OEE (a), PM com OEE (b), PF sem OEE (c) e PF com OEE (d) (Ampliação 200×).

Nas imagens de SEM apresentadas na Figura 10 verifica-se a existência de três camadas distintas, apesar de um leve arrastamento entre as mesmas que se deve ao facto dos laminados mostrarem alguma resistência à lâmina de corte durante a preparação das amostras. No entanto, nas quatro amostras verifica-se uma microestrutura coesa sem uma fronteira nítida entre as três camadas, o que comprova a boa adesão entre elas. A presença de plastificantes nos filmes individuais, sob as condições de temperatura e pressão da calandragem, promove uma incorporação destes na matriz da celulose contribuindo para uma maior adesão entre camadas [71]. Nos laminados PM (Figura 10 (a) e 10 (b)) é identificável a camada superior mais fina, compacta e homogénea de zeína, uma camada maior intermédia bastante porosa e heterogénea de celulose, e por fim, a camada inferior menos homogénea de pululana. Nos laminados PF (Figura 10 (c) e 10 (d)) a camada superior corresponde à celulose, a camada intermédia e mais compacta à zeína, e a camada inferior à pululana, sendo o aspeto das camadas semelhante aos laminados PM. A presença ou ausência do OEE nos filmes de pululana parece não conferir diferenças na microestrutura dos laminados.

A camada mais fina, compacta e homogénea de zeína quando comparada com a camada mais espessa de pululana também foi observada no trabalho realizado por Luís *et al.* [60]. A camada maior e mais porosa de celulose foi obtida nos laminados de zeína/celulose desenvolvidos por

Pinto M. [92], sendo as proporções das camadas semelhantes em ambos os trabalhos, do mesmo modo que não se observou uma fronteira clara entre as camadas o que indica uma boa adesão entre as estruturas.

5.3 – Espetros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos laminados

Os resultados da análise FTIR em ambas as faces dos laminados estão apresentados na Figura 11.

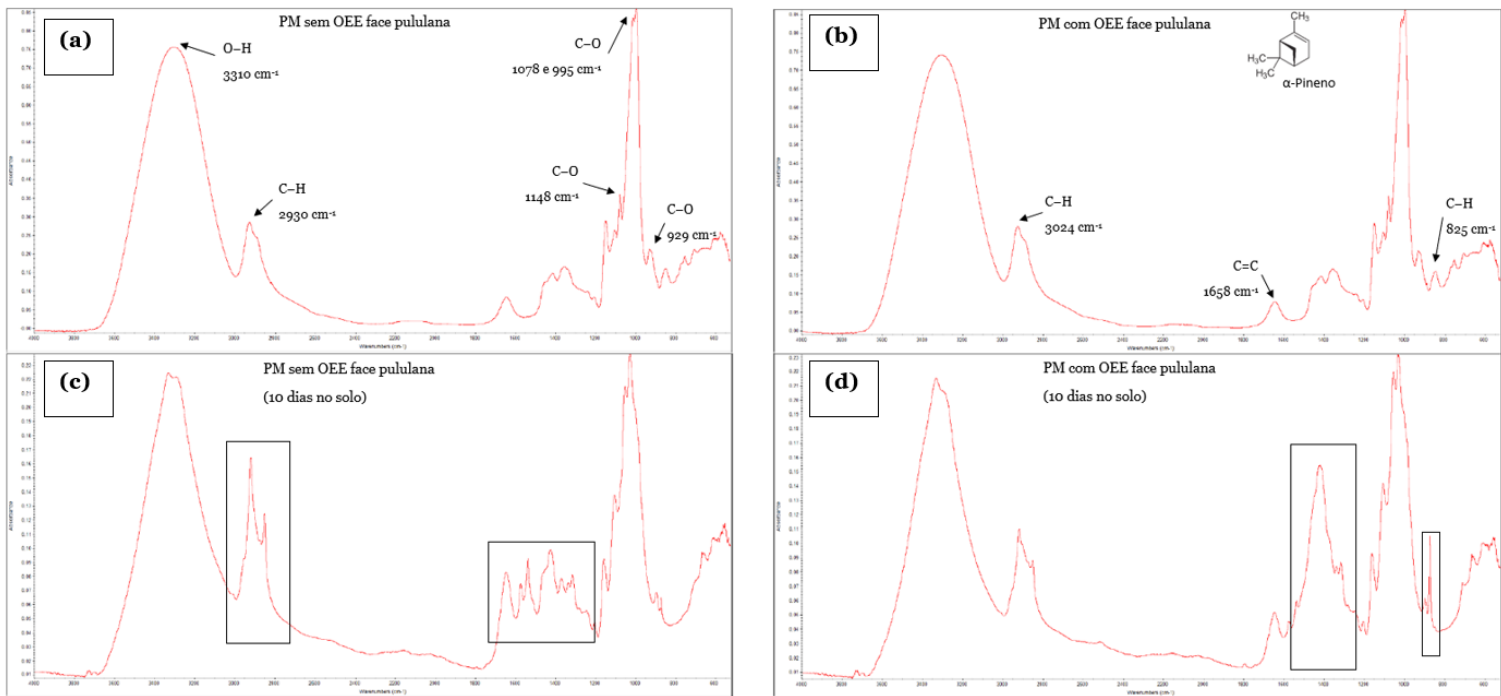


Figura 11 – Espetros de FTIR de ambas as faces dos laminados, e após o ensaio de biodegradabilidade no solo.

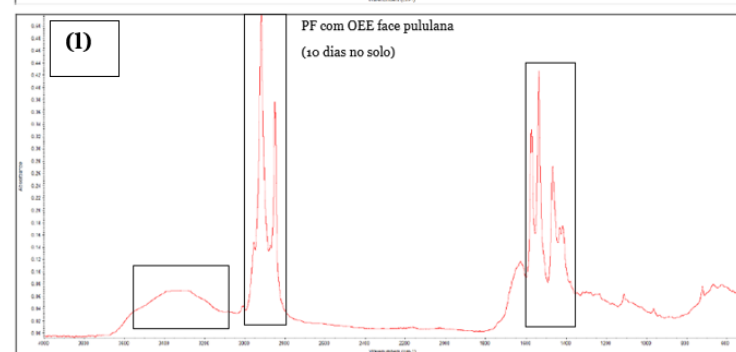
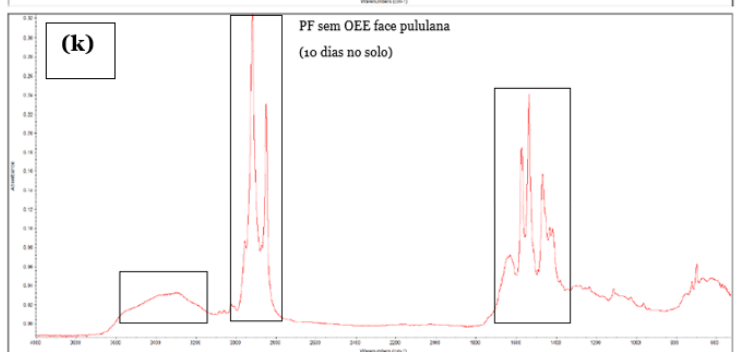
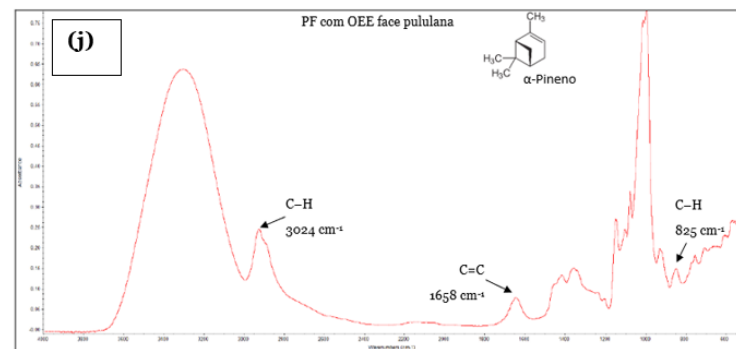
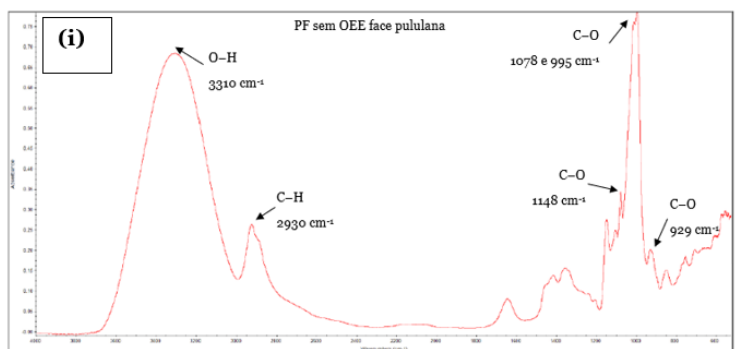
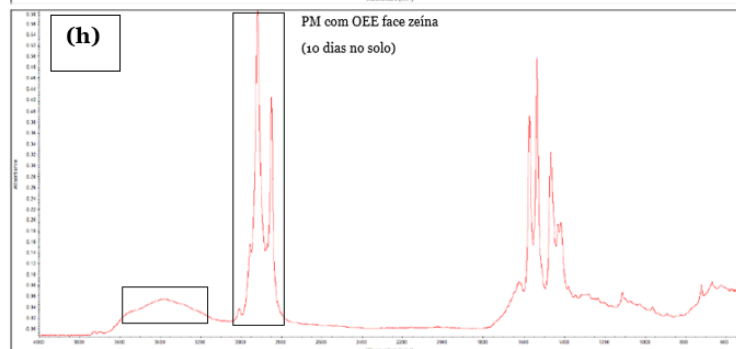
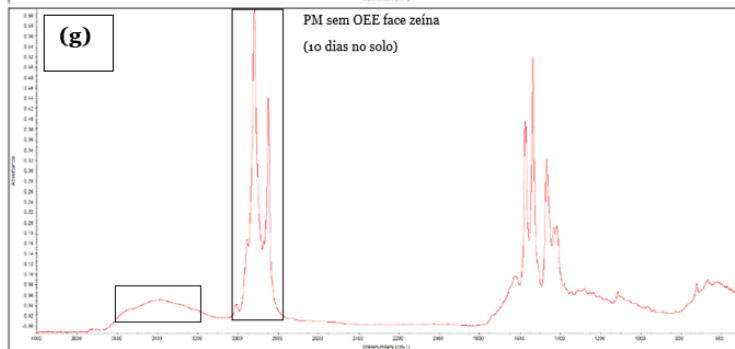
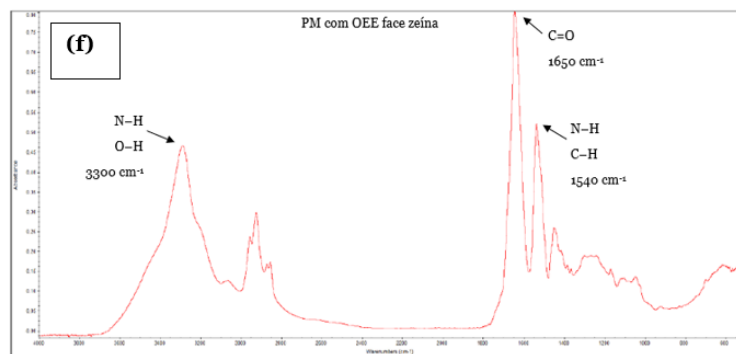
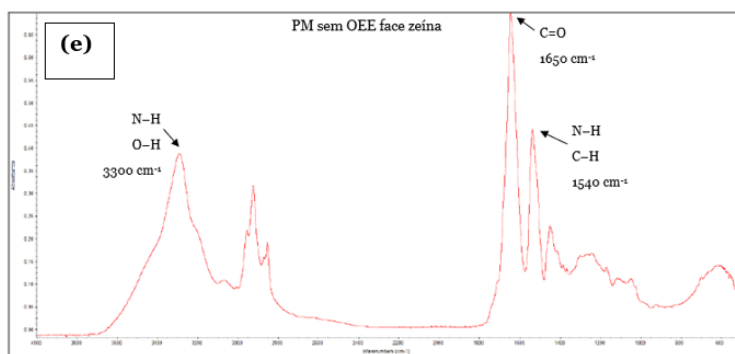


Figura 11 – (continuação).

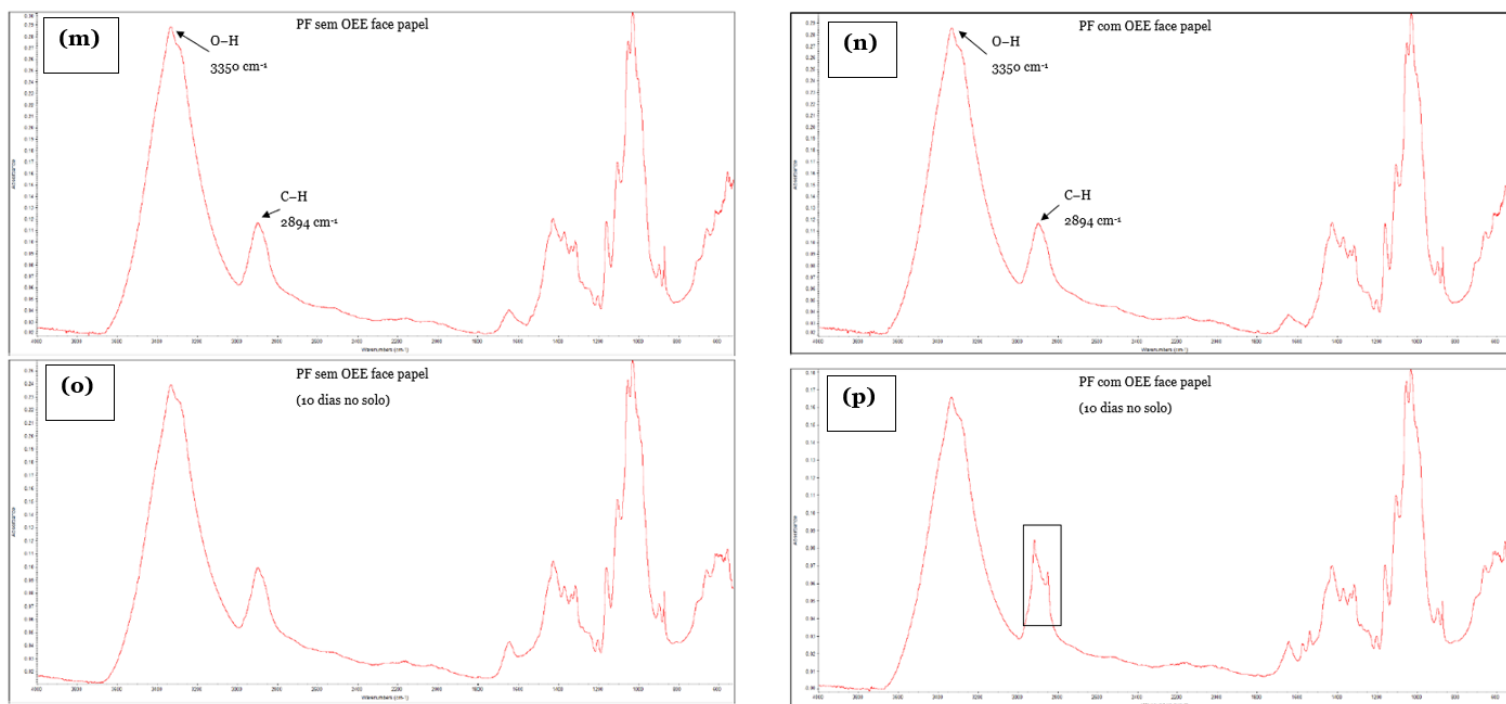


Figura 11 – (continuação).

Na face pululana do laminado PM sem OEE (Figura 11 (a)) foram detetadas bandas a 3310 cm^{-1} correspondentes ao alongamento dos grupos hidroxilo do polímero, sendo este um pico característico dos polissacáridos. O alongamento das ligações C–H é detetado a 2930 cm^{-1} , já os picos que surgem a 1148 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} , 995 cm^{-1} e 929 cm^{-1} estão associados à vibração de alongamento dos grupos C–O dos limites glicosídicos e etéricos da pululana [54]. O espectro de FTIR da face pululana com adição do OEE do laminado PM (Figura 11 (b)), não apresentou diferenças consideráveis quando comparado com a respetiva face sem OEE, isto porque a concentração de OE adicionada é relativamente inferior quando comparada à concentração da pululana. Apesar disso, foram identificados no espectro os picos característicos do composto maioritário do OEE (α -pineno), a banda detetada a 3024 cm^{-1} corresponde ao alongamento da ligação C–H insaturada, a 1658 cm^{-1} registou-se a banda correspondente à vibração de alongamento da ligação C=C, e a vibração de flexão devido a ligação C–H insaturada foi detetada a 885 cm^{-1} [54].

Os espectros correspondentes ao laminado PM face zeína sem e com OEE (Figura 11 (e) e 11 (f), respetivamente) são semelhantes, o que indica que o OEE, tal como se esperava, ficou incorporado apenas na camada de pululana e não migrou para as restantes camadas do laminado aquando do processo de calandragem [60]. Nos espectros correspondentes à face zeína foi identificada a banda a 3300 cm^{-1} que corresponde ao estiramento das ligações N–H e O–H dos aminoácidos que a constituem, a banda a 1650 cm^{-1} está associada ao estiramento do grupo carbonilo (C=O) da amida I do péptido e indica a existência de hélices α [93]. A 1540 cm^{-1} surge

a banda da amida II correspondente às vibrações de deformação angular da ligação N–H e às vibrações de estiramento das ligações C–H. Uma banda não tão evidente a 1260 cm^{-1} está associada à amida III e corresponde às vibrações de deformação axial das ligações C–N e às vibrações de flexão de C=O [93].

Os espectros da face pululana dos laminados PF com e sem OEE (Figura 11 (i) e 11 (j)) são semelhantes aos obtidos para os laminados PM da mesma face, indicando que o tipo de laminado não influencia a estrutura das camadas em si.

A face papel dos laminados PF apresenta espectros semelhantes com e sem OEE (Figura 11 (m) e 11 (n)), comprovando a incorporação do OE na camada da pululana. A 3350 cm^{-1} detetou-se uma banda correspondente ao alongamento das ligações O–H do grupo hidroxilo, uma vez que a celulose também é um polissacárido, a 2894 cm^{-1} observa-se a banda atribuída à vibração de alongamento das ligações C–H. A vibração das moléculas de água absorvidas pela celulose surge a 1633 cm^{-1} , já a estrutura cristalina e amorfa da celulose são atribuídas a bandas a 1425 cm^{-1} e 897 cm^{-1} , respetivamente [94].

No trabalho realizado por Luís *et al.* [54] onde foram produzidos filmes de pululana com incorporação de OEE, os espectros FTIR obtidos foram semelhantes aos obtidos para a face pululana nos laminados deste trabalho, observou-se também a sobreposição dos picos correspondentes ao α -pineno nas amostras com e sem OEE. Quanto à face zeína dos laminados, também está em concordância com os espectros FTIR obtidos no trabalho onde se desenvolveram filmes em bicamada de zeína e pululana realizado por Luís *et al.* [60]. Estes dados indicam que o processo de calandragem não modificou significativamente as matrizes dos filmes individuais utilizados.

5.4 – Análise do comportamento térmico dos laminados

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica termoanalítica que permite detetar alterações nas propriedades físicas e químicas dos materiais em função da temperatura. A Tg é a temperatura à qual um material sofre uma transição estrutural de um estado sólido amorfo para um estado mais viscoso e elástico, isto é, abaixo da Tg o material é rígido e frágil, enquanto acima torna-se mais flexível e maleável [54, 95].

Na Figura 12 estão representadas as curvas DSC dos laminados PM e PF com e sem OEE. No trabalho de Luís *et al.* [54] observou-se o efeito plastificante do OEE, dado que a sua incorporação levou a uma diminuição de Tg nos filmes de pululana produzidos.

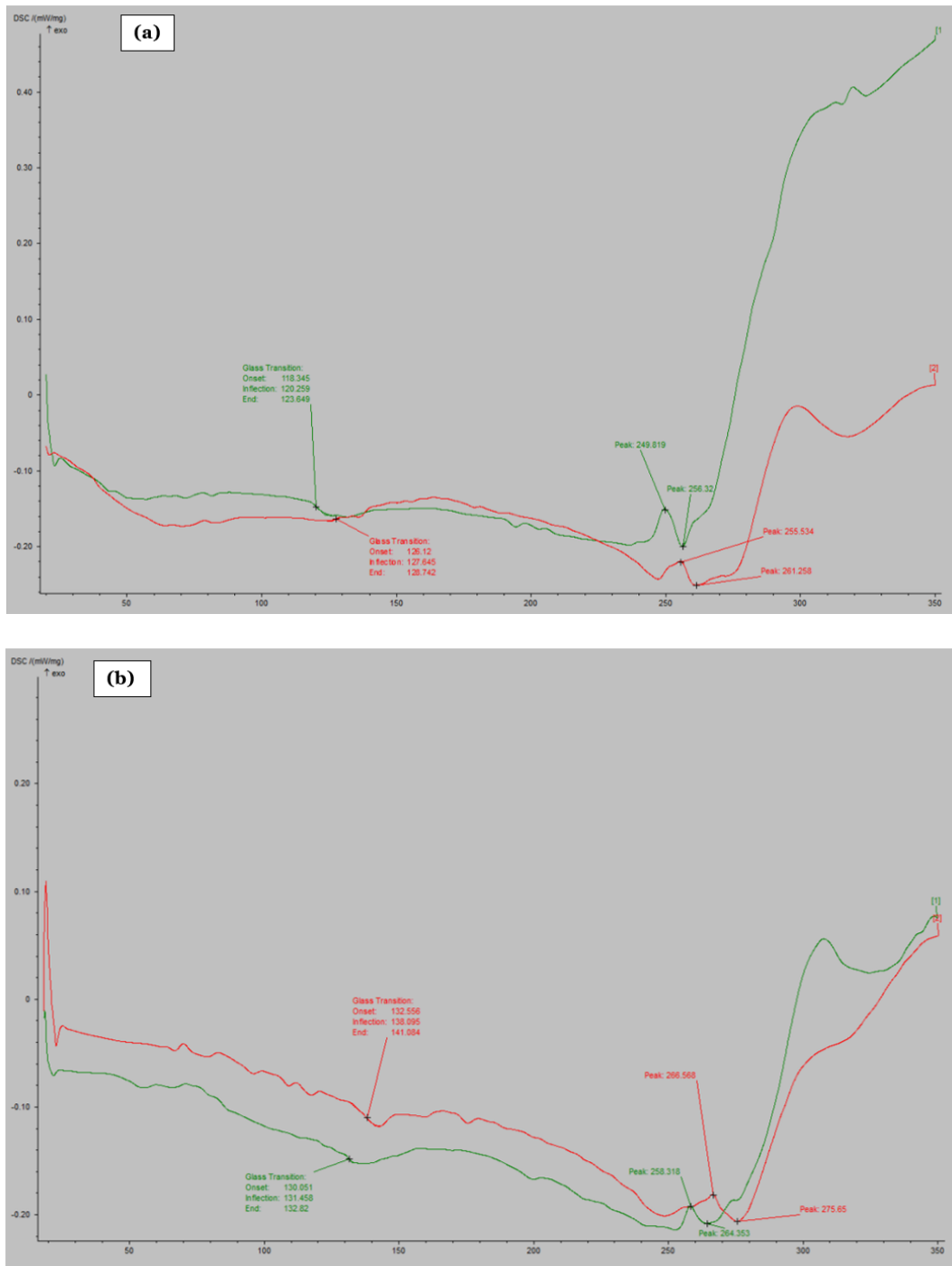


Figura 12 – Termogramas de DSC dos laminados PM (a) e PF (b) com e sem OEE (verde e vermelho, respectivamente).

A Tg da pululana é de 154,5 °C [54], da zeína é de 174 °C [46] e da celulose encontra-se no intervalo de 220 a 250 °C [96]. Considerando o efeito plastificante do OEE e ainda os plastificantes utilizados na produção dos filmes individuais, o glicerol e o ácido oleico, seria de esperar que a Tg dos laminados fosse mais baixa do que a dos seus constituintes individuais. Assim, é notória uma inflexão, correspondente à Tg, a 127 °C nos laminados PM sem OEE

(Figura 12 (a) a vermelho) e na curva do laminado com incorporação de OEE (Figura 12 (a) a verde). Essa inflexão dá-se a 120 °C, o que indica o efeito plastificante do OEE. Observa-se uma situação semelhante nos laminados PF, a inflexão na amostra sem OEE (Figura 12 (b) a vermelho) dá-se a 138 °C e a incorporação do OEE (Figura 12 (b) a verde) diminui a temperatura a que se observa essa inflexão para 131 °C.

A presença do OEE tem um efeito evidente no comportamento térmico do material, dado que em ambas as amostras se observa um pico exotérmico, nos laminados PM sem OEE a 255 °C e nos laminados PF sem OEE a 266 °C, que com a incorporação do OEE diminuiu para 249 °C e 258 °C, respetivamente.

Na gama de temperaturas entre 200 a 300 °C observam-se reações endotérmicas correspondentes a despolimerização parcial das cadeias poliméricas [97]. Este evento endotérmico observa-se a temperaturas mais baixas nos laminados com OEE do que nos laminados sem OEE.

As diferenças observadas no comportamento térmico dos laminados com incorporação do OEE indicam que a presença de OEE afeta a estrutura dos laminados e, conseqüentemente, as suas propriedades mecânicas [54].

5.5 – Caracterização dos laminados

5.5.1 – Espessura, gramagem e propriedades mecânicas dos laminados

A gramagem e a espessura dos materiais estão diretamente relacionadas com as suas propriedades funcionais. Geralmente, uma pequena espessura corresponde a fracas propriedades mecânicas e de barreira [82]. Por outro lado, uma grande espessura prejudica a flexibilidade do material.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da caracterização dos laminados quanto às suas propriedades estruturais e mecânicas.

Verificou-se que não existem diferenças com significado estatístico ao nível da espessura e da gramagem nos dois tipos de laminados ($p\text{-value}>0,05$) após incorporação do OEE. Era de esperar que a adição do OEE aumentasse estes parâmetros nos respetivos laminados, devido ao aumento dos sólidos totais na composição dos filmes de pululana [54], porém, como descrito por Chu *et al.* [62] isso nem sempre se verifica devido à hidrofobicidade do OE. Possivelmente as interações entre o OEE e a pululana limitaram a ocorrência de pontes de hidrogénio entre a pululana e a água. Além disso, o processo de calandragem para formação dos laminados com pressão e temperatura, leva a perda de água nos filmes individuais e posterior incorporação na matriz porosa do papel [71].

Tabela 2 – Gramagem, espessura e propriedades mecânicas dos laminados (média ± desvio padrão).

Propriedades	PM controle (sem OEE) ^a	PM com OEE ^b	PF controle (sem OEE) ^c	PF com OEE ^d	<i>p-value</i>	
Gramagem (g/m ²)	298,00 ± 6,99	286,17 ± 4,33	286,05 ± 9,85	284,89 ± 7,19	0,080 ^{ab} 0,878 ^{cd}	
Espessura (µm)	255,75 ± 15,47	257,37 ± 21,03	270,20 ± 8,84	261,60 ± 15,11	0,920 ^{ab} 0,453 ^{cd}	
Propriedades mecânicas	Alongamento à rutura (%)	7,01 ± 0,70	8,32 ± 0,27	5,52 ± 0,33	8,05 ± 1,28	0,069 ^{ab} 0,068 ^{cd}
	Índice de tração (N.m/g)	36,93 ± 3,43	38,23 ± 1,76	35,67 ± 2,81	28,86 ± 2,70	0,600 ^{ab} 0,039* ^{cd}
	Módulo elástico (MPa)	1907,08 ± 116,54	1906,38 ± 67,81	1734,15 ± 75,50	1784,65 ± 148,34	0,993 ^{ab} 0,636 ^{cd}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Um dos principais objetivos da embalagem alimentar é proteger o alimento de fatores externos, entre eles choques e forças de compressão [6], conseqüentemente torna-se crucial que o material desenvolvido tenha boas propriedades mecânicas. A junção entre papel e filmes de biopolímeros, assim como a adição de plastificantes são duas alternativas viáveis para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de biopolímeros. As propriedades mecânicas dependem diretamente do tipo de matriz, aditivos e interações entre eles [54], sendo que a adição de um OE normalmente afeta negativamente estas propriedades.

Neste trabalho, numa perspectiva geral, a adição do OEE não influenciou as propriedades mecânicas dos laminados, com exceção do índice de tração nos laminados PF ($p\text{-value} < 0,05$). Nos laminados PF verificou-se uma diminuição do índice de tração com a adição do OEE, o que indica que o OE diminui a resistência do material [60]. Sendo a função da celulose nos laminados a melhoria das propriedades mecânicas dos filmes individuais, nos laminados PM, o papel está em contacto tanto com a zeína como com a pululana, melhorando as propriedades mecânicas de ambos. Já nos laminados PF, o papel está apenas em contacto com a zeína e o OEE é incorporado na pululana, não havendo um contacto direto entre as duas matrizes, tornando-se mais perceptível a influência da adição do OEE nas propriedades mecânicas.

Em ambos os tipos de laminados, o alongamento à rutura e o módulo elástico não apresentaram diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} > 0,05$) quando o OEE é incorporado, o que indica que a junção dos três biopolímeros resultou numa melhoria geral das propriedades mecânicas

dos laminados. Além disso, o OEE foi adicionado a uma concentração de 15% p/p relativamente à pululana, uma concentração pequena quando comparada à totalidade dos componentes do laminado.

5.5.2 – Propriedades óticas dos laminados

As propriedades óticas de uma embalagem alimentar são um fator importante a considerar quanto se desenvolve um material para esse fim, uma vez que a embalagem é o que o consumidor vê em primeiro lugar e o que lhe causa a primeira impressão além de toda a estampagem de comunicação.

Uma embalagem deve preferencialmente permitir visualizar o alimento que contém, porém nos laminados com papel isso torna-se mais complicado. O papel é um material opaco e com uma transparência baixa, consequentemente os laminados apresentam uma transparência igualmente baixa, resultados apresentados na Tabela 3. Uma solução possível é fazer-se um corte no papel de modo a formar uma janela, ficando nessa zona apenas um filme em bicamada de zeína e pululana. A adição do OEE não interferiu significativamente na transparência.

Quanto à luminosidade, na face da zeína dos laminados PM não houve diferenças com significado estatístico ($p\text{-value}>0,05$), já na face da pululana a adição de OEE diminuiu significativamente ($p\text{-value}<0,05$) a coordenada de cor L^* , o que indica uma aparência ligeiramente mais escura dos laminados PM com OEE, mas impercetível a olho nu. Nos laminados PF com OEE também se verificou uma diminuição com significado estatístico ($p\text{-value}>0,05$) na coordenada de cor L^* na face do papel.

Tabela 3 – Propriedades óticas dos laminados (média \pm desvio padrão).

Propriedades óticas	PM controlo (sem OEE)		PM com OEE		<i>p-value</i>
	Face zeína ^a	Face pululana ^b	Face zeína ^c	Face pululana ^d	
L^* (luminosidade)	75,12 \pm 0,44	86,87 \pm 0,61	75,71 \pm 1,39	85,12 \pm 0,32	0,545 ^{ac} 0,021* ^{bd}
a^* (avermelhado)	1,47 \pm 0,15	3,80 \pm 0,03	0,16 \pm 0,04	3,50 \pm 0,05	0,003* ^{ac} 0,002* ^{bd}
b^* (amarelado)	38,96 \pm 0,99	-14,62 \pm 0,14	35,26 \pm 3,44	-13,44 \pm 0,32	0,197 ^{ac} 0,013* ^{bd}
Transparência (%)	31,47 \pm 3,07		30,66 \pm 1,58		0,712

Tabela 3 – Continuação.

Propriedades óticas	PF controlo (sem OEE)		PF com OEE		<i>p-value</i>
	Face papel ^e	Face pululana ^f	Face papel ^g	Face pululana ^h	
L* (luminosidade)	89,29 ± 0,16	76,25 ± 1,75	88,37 ± 0,14	73,50 ± 1,35	0,002* ^{eg} 0,102 ^{fh}
a* (avermelhado)	3,69 ± 0,02	0,64 ± 0,12	3,86 ± 0,06	2,03 ± 0,09	0,029* ^{eg} <0,001* ^{fh}
b* (amarelado)	-14,34 ± 0,16	32,17 ± 4,32	-14,53 ± 0,80	43,07 ± 5,39	0,723 ^{eg} 0,055 ^{fh}
Transparência (%)	32,47 ± 2,33		33,79 ± 2,23		0,518

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

A coordenada de cor a* teve uma diminuição significativa ($p\text{-value} < 0,05$) com a adição do OEE em ambas as faces do laminado PM, enquanto no laminado PF a mesma aumentou. Era esperado que a coordenada de cor b* fosse mais afetada devido à cor amarelada do OEE, porém isso apenas se verificou na face pululana dos laminados PM.

É de salientar que as coordenadas de cor da face pululana se assemelham aos da matriz com que esta está em contacto, devido à sua transparência, isto acontece porque na medição os valores obtidos resultam da contribuição de cada camada, pois trata-se de um material constituído por 3 camadas distintas.

5.5.3 – Propriedades de barreira dos laminados

Um material para embalagem alimentar deve apresentar, além de boas propriedades mecânicas e aparência adequada, boas propriedades de barreira que irão definir o alimento ao qual este material melhor se aplica. As propriedades de barreira relacionam-se com a capacidade de criar uma atmosfera protetora à volta do alimento para garantir a sua integridade durante todo o processo de manipulação até chegar ao consumidor final [54].

Neste trabalho foram avaliadas as permeabilidades ao vapor de água e ao óleo, não se obtendo diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} > 0,05$) entre os laminados com e sem OEE. Os resultados estão apresentados na Tabela 4. A resistência ao vapor de água diminui com o aumento de espessura [98], sendo os laminados compostos por três camadas diferentes, a sua espessura torna-se o fator principal a influenciar esta propriedade, consequentemente a adição do OEE não causou diferenças significativas.

No trabalho de Luís *et al.* [46], filmes de zeína mostraram ter ótimas propriedades de barreira com valores de WVTR de $31,53 \pm 3,38$ g/m².dia, já os filmes de pululana desenvolvidos no trabalho de Luís *et al.* [88] apresentaram um valor de WVTR de $55,50 \pm 1,76$ g/m².dia. Enquanto o papel estudado no trabalho de Ramos *et al.* [71] apresentou um valor de WVTR de $672,9 \pm 5,1$ g/m².dia. Nos laminados desenvolvidos neste trabalho obtiveram-se valores de WVTR de $17,77 \pm 0,44$ g/m².dia no laminado PM sem OEE e $18,40 \pm 3,09$ g/m².dia nos laminados PF sem OEE, o que indica uma resistência à passagem do vapor de água muito maior nos laminados do que nos filmes e papel individuais, comprovando assim a eficácia da junção dos três materiais.

Tabela 4 – Propriedades de barreira dos laminados (média \pm desvio padrão).

Propriedades de barreira		PM controlo (sem OEE) ^a	PM com OEE ^b	PF controlo (sem OEE) ^c	PF com OEE ^d	<i>p-value</i>
Vapor de água	WVTR (g/m ² .dia)	$17,77 \pm 0,44$	$21,20 \pm 5,29$	$18,40 \pm 3,09$	$21,52 \pm 0,44$	$0,378^{ab}$
						$0,221^{cd}$
	WVP (g/Pa.dia.m)	$3,44 \times 10^{-6} \pm 8,53 \times 10^{-8}$	$4,13 \times 10^{-6} \pm 1,03 \times 10^{-6}$	$3,76 \times 10^{-6} \pm 6,31 \times 10^{-7}$	$4,26 \times 10^{-6} \pm 8,73 \times 10^{-8}$	$0,366^{ab}$
						$0,303^{cd}$
Óleo	PO (g.mm/m ² .dia)	$29,78 \pm 2,86$	$25,12 \pm 1,23$	$25,74 \pm 2,13$	$26,61 \pm 2,51$	$0,090^{ab}$
						$0,671^{cd}$

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

A permeabilidade ao óleo é uma propriedade interessante de ser estudada no material que se destina a embalagem alimentar, uma vez que muitos alimentos contêm elevados teores de gordura na sua composição. Era de esperar que a PO fosse baixa dada a existência de grupos hidroxilo hidrofílicos nas moléculas de pululana e celulose, que impediriam a adsorção do óleo [99]. No entanto, o ensaio demonstrou uma PO relativamente elevada o que se pode justificar com o efeito dos plastificantes utilizados que aumentaram o volume livre entre moléculas da matriz facilitando assim a penetração do óleo [88].

5.6 – Propriedades de superfície dos laminados

O ângulo de contacto é o método mais frequentemente utilizado para avaliar a hidrofobicidade/hidrofilicidade de uma superfície [54]. Um ângulo de contacto com água superior a 90° é característico de uma superfície de natureza hidrofóbica, enquanto um ângulo de contacto com água inferior a 90° caracteriza uma superfície hidrofílica.

A Tabela 5 resume os valores dos ângulos de contacto obtidos nas duas faces dos laminados. Ao contrário do que se esperava, o ângulo de contacto com água das faces de pululana dos laminados PM e PF com OEE diminuiu significativamente ($p\text{-value} < 0,05$). Em trabalhos anteriores verificou-se que a incorporação do OEE aumentava o ângulo de contacto com água das superfícies devido à sua hidrofobicidade [54]. O mesmo se verificou na face de pululana dos laminados PM, em que o ângulo de contacto com DI diminuiu com a adição do OEE. Os ângulos de contacto com EG não demonstraram alterações significativas ($p\text{-value} > 0,05$) com a incorporação do OEE. Os ângulos de contacto das faces zeína e papel não sofrem alterações consideráveis visto que não são influenciados pelo OE.

Tabela 5 – Propriedades de superfície dos laminados (média \pm desvio padrão).

Propriedades de superfície		PM controlo (sem OEE)		PM com OEE		<i>p-value</i>
		Face zeína ^a	Face pululana ^b	Face zeína ^c	Face pululana ^d	
Ângulo de contacto (°)	Água	67,85 \pm 3,50	64,99 \pm 1,14	74,86 \pm 3,19	55,79 \pm 3,29	0,063 ^{ac} 0,029* ^{bd}
	DI	43,48 \pm 1,17	50,78 \pm 3,08	44,88 \pm 0,95	42,53 \pm 1,57	0,186 ^{ac} 0,026* ^{bd}
	EG	57,91 \pm 2,45	62,79 \pm 5,30	62,39 \pm 1,84	59,80 \pm 1,76	0,069 ^{ac} 0,436 ^{bd}
Energia de superfície (mN/m)	Polar	2,33 \pm 0,52	10,70 \pm 1,17	0,96 \pm 0,25	2,12 \pm 0,43	0,028* ^{ac} 0,003* ^{bd}
	Dispersiva	37,53 \pm 0,61	32,20 \pm 1,66	36,86 \pm 0,51	37,25 \pm 0,80	0,220 ^{ac} 0,019* ^{bd}
	Total	39,76 \pm 0,81	42,90 \pm 2,03	37,82 \pm 0,58	39,37 \pm 0,91	0,033* ^{ac} 0,077 ^{bd}

Tabela 5 – (Continuação).

Propriedades de superfície	PF controlo (sem OEE)		PF com OEE		<i>p-value</i>	
	Face papel ^e	Face pululana ^f	Face papel ^g	Face pululana ^h		
Ângulo de contacto (°)	Água	113,75 ± 2,14	67,48 ± 0,54	115,06 ± 1,93	51,36 ± 2,68	0,476 ^{eg} 0,007 ^{*fh}
	DI	77,44 ± 3,64	43,58 ± 3,36	80,96 ± 2,08	45,26 ± 1,93	0,237 ^{eg} 0,504 ^{fh}
	EG	87,24 ± 2,72	58,60 ± 1,72	90,28 ± 0,99	58,72 ± 0,96	0,184 ^{eg} 0,922 ^{fh}
Energia de superfície (mN/m)	Polar	0,05 ± 0,02	6,89 ± 0,77	0,10 ± 0,01	2,37 ± 0,37	0,032 ^{*eg} 0,003 ^{*fh}
	Dispersiva	19,25 ± 1,80	30,17 ± 1,44	17,28 ± 0,99	33,94 ± 0,97	0,192 ^{eg} 0,025 ^{*fh}
	Total	19,31 ± 1,80	37,06 ± 1,63	17,39 ± 0,99	36,25 ± 1,04	0,201 ^{eg} 0,515 ^{fh}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

A partir dos ângulos de contacto com os três líquidos de referência foi calculada a energia de superfície dos laminados, aplicando-se o método OWRK. Nos dois tipos de laminados verificou-se uma diminuição significativa ($p\text{-value} < 0,05$) da componente polar, com a adição do OEE, tanto na face zeína/papel como face pululana. O OEE tem natureza hidrofóbica, como comprovado no trabalho de *Luís et al.* [54], logo a sua incorporação nos laminados leva a diminuição da hidrofiliçidade da superfície essencialmente na face (hidrofílica) onde o OE é incorporado. A possível migração do OEE entre camadas pode justificar a diminuição da componente polar nas outras faces.

É de salientar um aumento na componente dispersiva da face pululana em ambos os tipos de laminados, o que era espectável sendo esta a face onde é incorporado o OEE. Os resultados são concordantes entre si de modo que a componente polar diminuiu enquanto a componente dispersiva aumentou com a adição do OEE aos filmes de pululana.

A energia de superfície total corresponde à soma das duas componentes e, com exceção da diminuição da energia de superfície na face zeína dos laminados PM que se deve à diminuição da componente polar, para as restantes faces de ambos os tipos de laminados, não se verificaram diferenças significativas ($p\text{-value} > 0,05$).

5.7 – Avaliação das propriedades antioxidantes dos laminados

A adição de um composto bioativo com propriedades antioxidantes tem a capacidade de prevenir ou retardar a oxidação lipídica, que é uma das principais causas da deterioração dos alimentos, evitando assim o aparecimento de ranço, perda nutricional e geração de compostos tóxicos [54, 100]. Nesse âmbito, as propriedades antioxidantes dos laminados produzidos foram avaliadas pelo ensaio de sequestração dos radicais livres DPPH e pelo teste de branqueamento do β -caroteno.

O ensaio da sequestração dos radicais livres DPPH demonstrou atividade antioxidante dos laminados, como apresentado na Figura 13. De um modo geral, os laminados PM com e sem OEE apresentaram maior percentagem de inibição (55-70%). Por outro lado, os laminados PF com e sem OEE, apesar de um pouco mais baixa, também apresentaram capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH, apresentando uma percentagem inibição entre 40-60%. Não se verificaram grandes diferenças entre os laminados com e sem OEE devido à presença da zeína que possui atividade antioxidante intrínseca [46]. Foram também determinados os coeficientes de correlação linear (R^2) das retas das regressões lineares obtidas (% de inibição em função do tempo), que se verificaram ser baixos, indicando que não existe uma relação direta entre a capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH e o tempo de reação. A libertação do OEE pode não ter sido igualmente gradual durante as 5 horas.

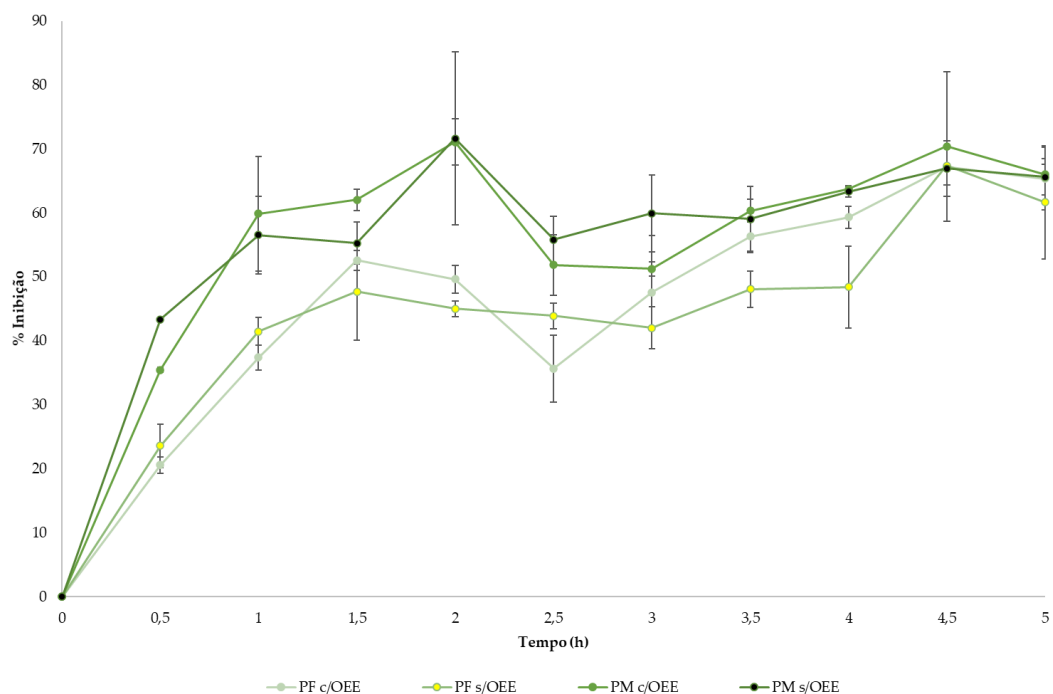


Figura 13 – Atividade antioxidante dos laminados medida pelo ensaio de sequestração de DPPH.

Dado o modelo alimentar proposto para os laminados desenvolvidos ser o fiambre fresco que, como outros produtos da charcutaria, apresenta na sua constituição gordura, foi realizado o teste de branqueamento do β -caroteno que permite avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividade antioxidante medida pelo teste de branqueamento do β -caroteno (média \pm desvio padrão).

Branqueamento do β-caroteno	PM controlo (sem OEE) ^a	PM com OEE ^b	PF controlo (sem OEE) ^c	PF com OEE ^d	<i>p</i>-value
% Inibição	11,91 \pm 0,48	18,67 \pm 1,76	11,80 \pm 1,14	17,9 \pm 0,76	0,016* ^{ab} 0,003* ^{cd}

* indica diferenças com significado estatístico (p -value<0,05); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Verificou-se que a adição do OEE melhora significativamente (p -value<0,05) a capacidade de inibir a peroxidação lipídica nos dois tipos de laminados.

Assim, confirma-se a potencialidade da aplicação dos laminados desenvolvidos neste trabalho como novos materiais de embalagem alimentar dada a sua capacidade de inibir e/ou evitar a oxidação e peroxidação lipídica, e com isso, aumentar o tempo de prateleira do alimento embalado.

5.8 – Avaliação das propriedades antimicrobianas dos laminados

Os agentes antimicrobianos têm capacidade de inibir ou retardar o crescimento microbiano responsável pela rápida deterioração dos alimentos e pela transmissão de doenças [34]. Visto que o OEE possui atividade antimicrobiana [54], a atividade antimicrobiana dos laminados também foi avaliada através do teste da difusão em agar, cujos resultados se encontram na Tabela 7.

Para as bactérias Gram-positivas observou-se uma melhoria significativa (p -value<0,05) da atividade antimicrobiana dos laminados com a adição do OEE, medindo-se um halo de inibição em todos os laminados com OEE. Esta melhoria foi mais notória nos laminados PM em *L. monocytogenes* e em *E. faecalis*. Enquanto os laminados PF com OEE tiveram maior efeito contra *B. cereus* e *S. aureus*.

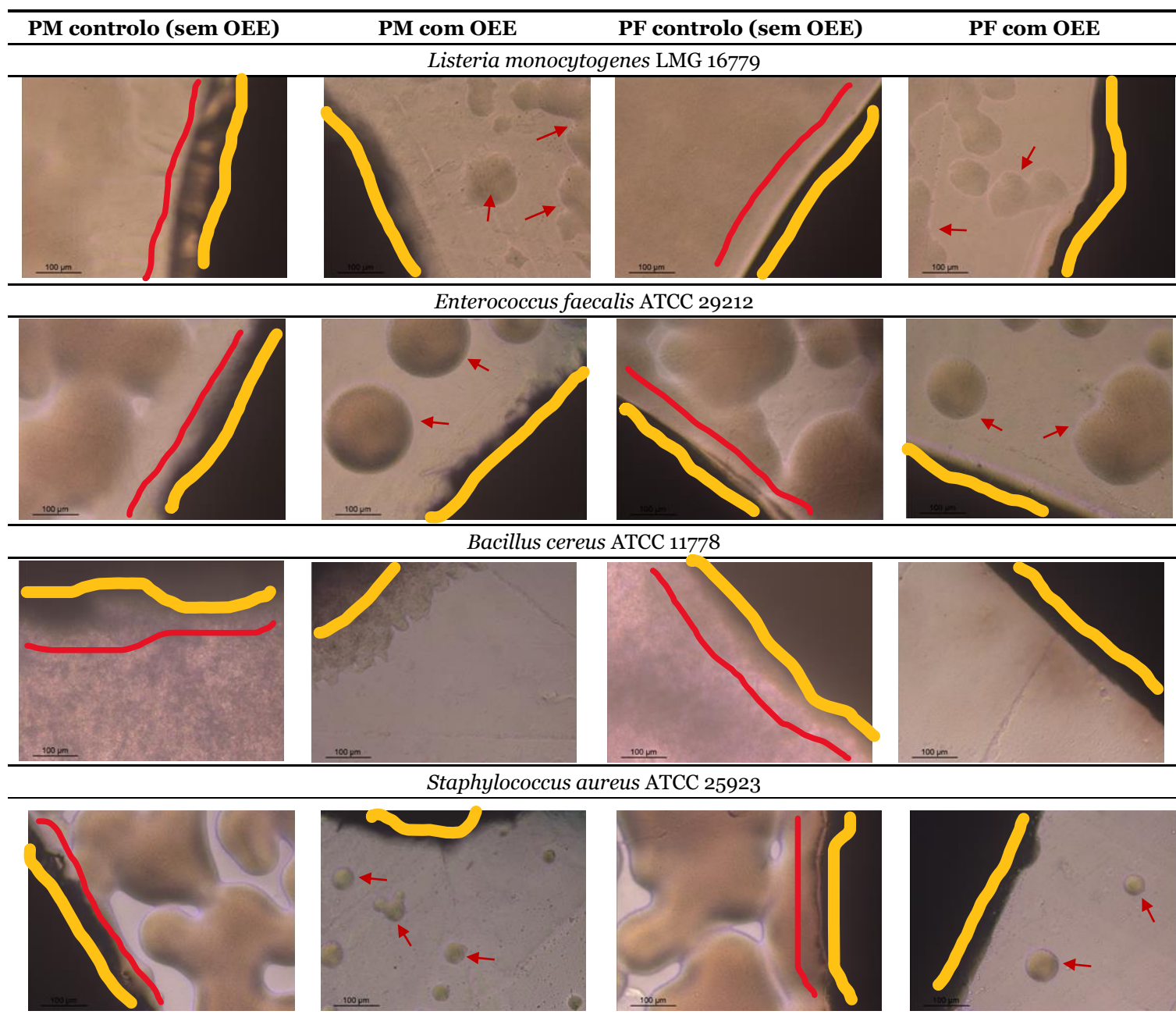
Tabela 7 – Propriedades antimicrobianas dos laminados obtidos através do teste da difusão em agar (média ± desvio padrão).

Teste da difusão em agar		PM controlo (sem OEE) ^a	PM com OEE ^b	PF controlo (sem OEE) ^c	PF com OEE ^d	<i>p-value</i>	
Diâmetro dos halos de inibição (mm)	Gram-positivas	<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	6,00 ± 0,00	8,86 ± 0,51	6,00 ± 0,00	8,46 ± 1,35	<u>0,010[*] ab</u> 0,087 ^{cd}
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	6,00 ± 0,00	7,13 ± 0,20	6,00 ± 0,00	7,26 ± 0,86	<u>0,010[*] ab</u> 0,126 ^{cd}
		<i>B. cereus</i> ATCC 11778	6,00 ± 0,00	6,90 ± 1,27	6,00 ± 0,00	8,16 ± 0,23	<u>0,345^{ab}</u> 0,004 ^{* cd}
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6,32 ± 0,45	8,16 ± 1,17	6,00 ± 0,00	8,46 ± 0,18	<u>0,098^{ab}</u> 0,002 ^{* cd}
	Gram-negativas	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<u>>0,05^{ab}</u> >0,05 ^{cd}
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<u>>0,05^{ab}</u> >0,05 ^{cd}
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<u>>0,05^{ab}</u> >0,05 ^{cd}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

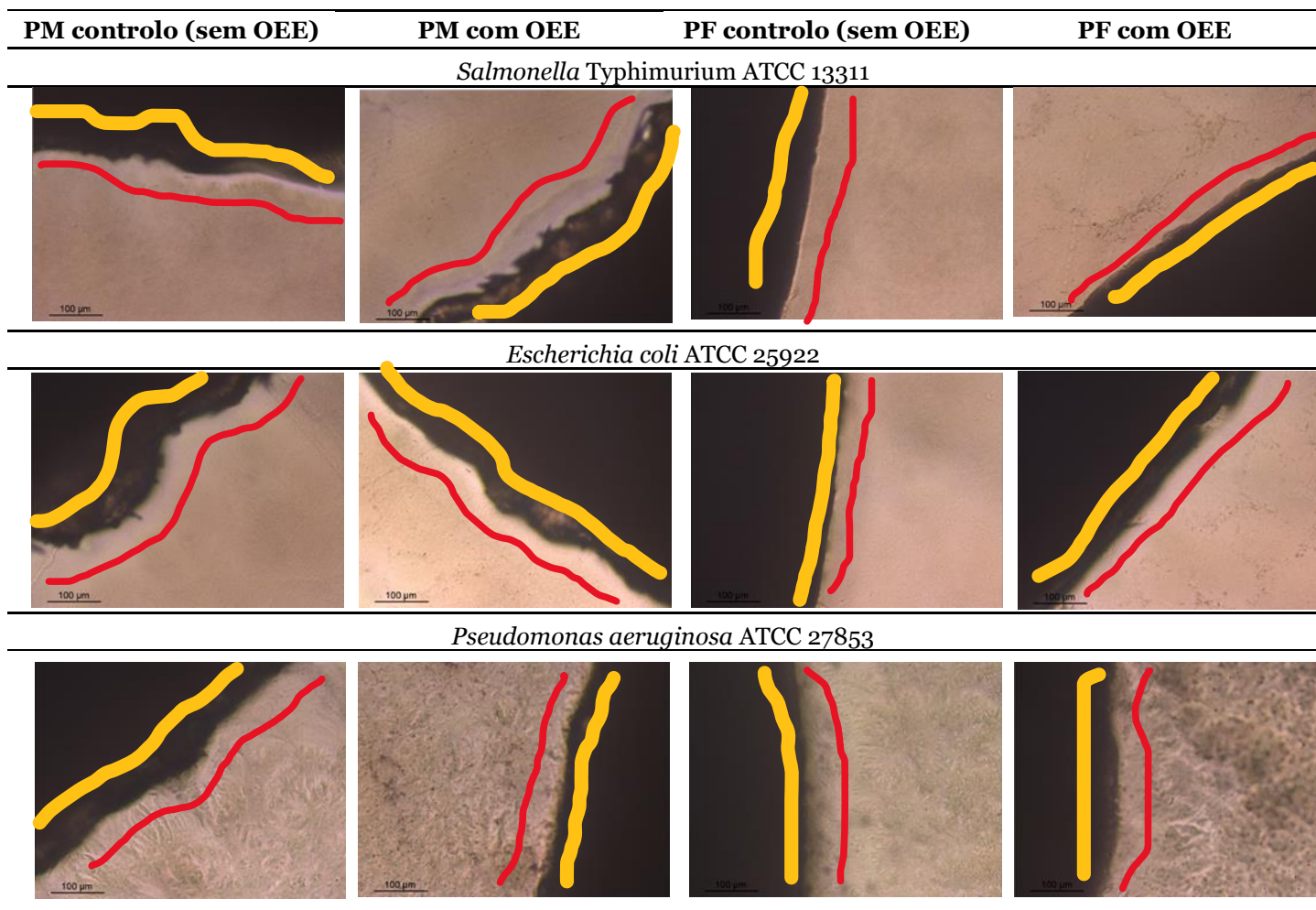
As bactérias Gram-negativas são naturalmente mais resistentes devido à sua membrana externa. Neste estudo apenas se observou inibição do crescimento bacteriano por contacto nos laminados PM com e sem OEE em *E. coli* e *S. Typhimurium*, enquanto em *P. aeruginosa* não foi registado efeito com nenhuma amostra. Estes resultados foram ainda confirmados através da observação das placas de Petri por microscopia ótica, cujas imagens se encontram resumidas na Tabela 8.

Tabela 8 – Imagens de microscopia ótica da atividade antibacteriana (Ampliação: 100×).



As zonas mais escuras delimitadas por riscos amarelos correspondem aos laminados, as setas e os riscos vermelhos indicam colónias de bactérias, já os espaços mais claros são zonas sem crescimento bacteriano.

Tabela 8 - (continuação).



As zonas mais escuras delimitadas por riscos amarelos correspondem aos laminados, as setas e os riscos vermelhos indicam colónias de bactérias, já os espaços mais claros são zonas sem crescimento microbiano.

A Tabela 8 apresenta as imagens obtidas por microscopia ótica das placas de Petri inoculadas onde se observa a atividade antibacteriana dos laminados, estas imagens estão em concordância com os resultados apresentados na Tabela 7. Nas imagens observam-se zonas muito escuras (delimitadas a amarelo) que correspondem aos laminados, o que indica que estes mantêm a sua integridade durante a incubação com os microrganismos [88]. Nas imagens correspondentes às bactérias Gram-negativas observa-se um crescimento microbiano muito intenso próximo dos laminados e, em certos casos, por cima do próprio laminado, o que não foi possível registar no microscópio devido à opacidade do laminado. Já nas imagens que retratam o crescimento das bactérias Gram-positivas consegue distinguir-se claramente um halo de inibição em todos os laminados com OEE quando comparados com os respetivos laminados sem OEE.

5.9 – Aplicação dos laminados num modelo alimentar

Para testar a eficácia dos laminados produzidos foi utilizado um modelo alimentar. Foram produzidas caixas dos dois tipos de laminados com e sem OEE, tentando ao máximo representar uma embalagem alimentar convencional, e no seu interior foi armazenado fiambre fresco, sendo que a face pululana se posicionou sempre para o interior da caixa de forma que estivesse em contacto com o fiambre. Durante a produção das caixas verificou-se que o laminado PF é mais facilmente dobrável do que o laminado PM. Além disso, após os sete dias do ensaio, verificou-se que caixas do laminado PF mantiveram um bom aspeto enquanto as de laminado PM ficaram mais moles e enfraquecidas, o que se deve à humidade do frigorífico onde as caixas foram armazenadas.

A Figura 14 mostra o aspeto das caixas obtidas com o fiambre no início (dia 0) e final do ensaio (dia 7), em que na parte superior da caixa foi criado um corte em forma de janela (recortou-se o papel), de forma a permitir visualizar o fiambre no seu interior. Os critérios de avaliação basearam-se na diferença na textura, cor e PP (%) do fiambre embalado nos laminados e no plástico no início e após os sete dias de armazenamento a 4°C.

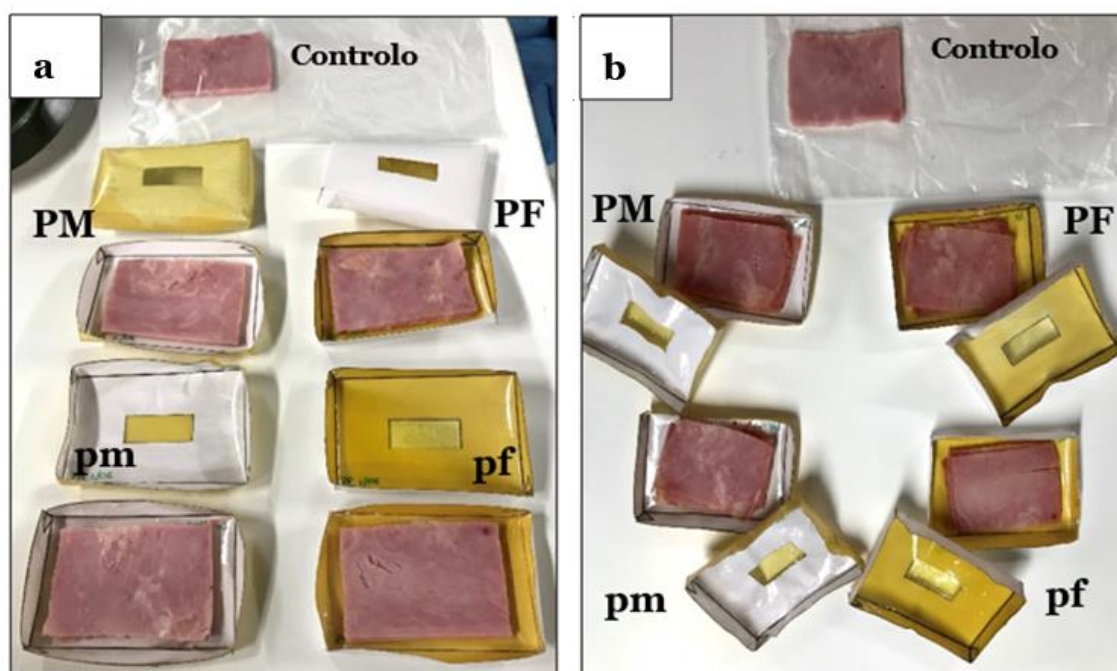


Figura 14 – Caixas produzidas com os laminados PM e PF com e sem OEE em maiúsculas e minúsculas respetivamente, no início (a) e após sete dias (b).

Ao longo do tempo os alimentos frescos tendem a perder humidade, responsável pela sua frescura, logo endurecem, perdem peso e a sua cor sofre alterações. Os resultados obtidos relativos à avaliação da textura, cor e perda de peso do fiambre estão apresentados na Tabela 9.

O plástico utilizado como embalagem controlo representa as embalagens plásticas comumente utilizadas para embalar o fiambre fresco. Após os sete dias de armazenamento observou-se que a força e a energia de deformação aumentaram significativamente ($p\text{-value}<0,05$) nas embalagens PM com e sem OEE, o que indica que esses materiais tiveram a pior performance quando comparadas com os restantes. O aumento da força e da energia de deformação traduzem-se no endurecimento do fiambre, isto é, uma superfície mais dura necessita de maior força e mais energia para causar uma deformação.

Verificou-se ainda uma perda de peso significativa ($p\text{-value}<0,05$) no fiambre embalado em todas as embalagens, incluindo o plástico, mostrando que esta é um processo natural e inevitável nos alimentos frescos [101]. A PP (%) foi maior nos laminados PM quando comparados com os laminados PF. O controlo perdeu $17,77\pm 8,68$ % do peso inicial, enquanto o fiambre embalado com os laminados produzidos neste trabalho perdeu cerca de 10% a mais que o fiambre embalado com o plástico.

Ao nível da cor do fiambre não foram registadas alterações significativas ($p\text{-value}>0,05$), com exceção do fiambre armazenado no laminado PM com OEE cuja luminosidade diminuiu significativamente ($p\text{-value}<0,05$), isto é, escureceu. Porém, visualmente, o fiambre após os sete dias de armazenamento tinha aspeto mais seco e escuro, principalmente nos cantos, o que se pode confirmar na Figura 14.

Tabela 9 – Resultados dos testes realizados no fiambre do modelo alimentar (média ± desvio padrão).

	0 dias ^a		7 dias				<i>p-value</i>	
	Plástico		PM sem OEE ^c	PM com OEE ^d	PF sem OEE ^e	PF com OEE ^f		
	(controle) ^b							
Texturómetro	Força de deformação (N)	28,16 ± 3,42	33,28 ± 3,16	45,71 ± 7,26	41,67 ± 3,58	37,25 ± 6,40	40,51 ± 8,11	0,130 ^{ab}
								0,035* ^{ac}
Texturómetro	Energia de deformação (N.mm)	12,67 ± 1,19	13,40 ± 1,92	19,53 ± 3,39	17,78 ± 1,74	15,27 ± 2,57	16,46 ± 3,76	0,009* ^{ad}
								0,117 ^{ae}
Texturómetro	PP (%)	-	17,77 ± 8,68	31,88 ± 13,15	27,74 ± 7,66	24,83 ± 7,88	30,30 ± 12,86	0,103 ^{af}
								0,611 ^{ab}
Texturómetro	L* (luminosidade)	70,73 ± 1,07	68,97 ± 0,64	67,72 ± 3,14	67,27 ± 1,47	70,31 ± 1,03	68,40 ± 1,23	0,060 ^{ac}
								0,018* ^{ad}
Texturómetro	a* (avermelhado)	11,93 ± 0,41	10,85 ± 0,52	11,82 ± 1,83	12,12 ± 0,71	10,32 ± 1,11	10,23 ± 1,26	0,216 ^{ae}
								0,217 ^{af}
Texturómetro	b* (amarelado)	14,55 ± 0,84	14,03 ± 0,28	13,56 ± 5,23	15,96 ± 0,67	15,52 ± 1,03	16,05 ± 1,08	<0,001* ^{ab}
								<0,001* ^{ac}
Cor	L* (luminosidade)	70,73 ± 1,07	68,97 ± 0,64	67,72 ± 3,14	67,27 ± 1,47	70,31 ± 1,03	68,40 ± 1,23	<0,001* ^{ad}
								<0,001* ^{ae}
Cor	a* (avermelhado)	11,93 ± 0,41	10,85 ± 0,52	11,82 ± 1,83	12,12 ± 0,71	10,32 ± 1,11	10,23 ± 1,26	<0,001* ^{af}
								0,085 ^{ab}
Cor	b* (amarelado)	14,55 ± 0,84	14,03 ± 0,28	13,56 ± 5,23	15,96 ± 0,67	15,52 ± 1,03	16,05 ± 1,08	0,233 ^{ac}
								0,034* ^{ad}
Cor	a* (avermelhado)	11,93 ± 0,41	10,85 ± 0,52	11,82 ± 1,83	12,12 ± 0,71	10,32 ± 1,11	10,23 ± 1,26	0,650 ^{ae}
								0,070 ^{af}
Cor	b* (amarelado)	14,55 ± 0,84	14,03 ± 0,28	13,56 ± 5,23	15,96 ± 0,67	15,52 ± 1,03	16,05 ± 1,08	0,051 ^{ab}
								0,928 ^{ac}
Cor	L* (luminosidade)	70,73 ± 1,07	68,97 ± 0,64	67,72 ± 3,14	67,27 ± 1,47	70,31 ± 1,03	68,40 ± 1,23	0,713 ^{ad}
								0,116 ^{ae}
Cor	a* (avermelhado)	11,93 ± 0,41	10,85 ± 0,52	11,82 ± 1,83	12,12 ± 0,71	10,32 ± 1,11	10,23 ± 1,26	0,134 ^{af}
								0,399 ^{ab}
Cor	b* (amarelado)	14,55 ± 0,84	14,03 ± 0,28	13,56 ± 5,23	15,96 ± 0,67	15,52 ± 1,03	16,05 ± 1,08	0,776 ^{ac}
								0,089 ^{ad}
Cor	L* (luminosidade)	70,73 ± 1,07	68,97 ± 0,64	67,72 ± 3,14	67,27 ± 1,47	70,31 ± 1,03	68,40 ± 1,23	0,277 ^{ae}
								0,135 ^{af}

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value}<0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

5.10 – Ensaio de biodegradabilidade dos laminados

A biodegradabilidade é um dos principais requisitos para os novos materiais de embalagem que visam substituir as embalagens constituídas por polímeros sintéticos [51]. Por esse motivo é importante estudar a biodegradabilidade do material alternativo produzido. Neste trabalho avaliou-se a biodegradabilidade dos laminados quando enterrados no solo, de modo a prever as condições em que o material se pode encontrar após o descarte – a compostagem.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, verificou-se uma perda de peso de cerca de 50% nas amostras que estiveram no solo por 10 dias. Inicialmente foi realizado um ensaio similar por 20 dias que levou à degradação total das amostras

Tabela 10 – Perda de peso (%) dos laminados no ensaio de biodegradabilidade (média ± desvio padrão).

Biodegradabilidade	PM controlo (sem OEE) ^a	PM com OEE ^b	PF controlo (sem OEE) ^c	PF com OEE ^d	<i>p-value</i>
PP (%)	Solo				0,792 ^{ab}
	(10 dias)	40,55 ± 2,06	39,98 ± 2,81	45,28 ± 5,20	51,17 ± 2,46

* indica diferenças com significado estatístico ($p\text{-value} < 0,05$); ^{a b c d} indicam os pares de amostras em comparação estatística.

Na Figura 15 apresenta-se o aspeto dos laminados no dia 0 do ensaio e após os 10 dias no solo, sendo notória a degradação de todas as amostras com consequente perda do seu brilho inicial, o que indica redução significativa da camada de pululana. Estes resultados foram ainda confirmados através dos espectros de FTIR obtidos das amostras após o ensaio de biodegradabilidade na secção 4.12.

A degradação dos laminados quando enterrados no solo foi verificada por diminuição da intensidade das bandas nos laminados PM com e sem OEE (Figura 11 (c) e 11 (d)), o que indica que houve alteração na estrutura da face pululana quando comparada à estrutura inicial (Figura 11 (a) e 11 (b)). Na Figura 11 (c), a 1420-1430 cm^{-1} observa-se uma banda que pode estar associada com a estrutura cristalina da celulose e a 897 cm^{-1} , banda correspondente à estrutura amorfa da celulose [94], indicando que se deu a degradação da pululana e o espectro corresponde parcialmente à celulose, camada seguinte do laminado em questão.

A degradação na face zeína dos laminados PM com e sem OEE (Figura 11 (g) e 11 (h)) traduz-se numa diminuição da intensidade da banda a 3300 cm^{-1} e no aparecimento de duas bandas a 2800-3000 cm^{-1} correspondente ao alongamento das ligações C–H.

Nos espectros correspondentes à degradação na face pululana dos laminados PF com e sem OEE (Figura 11 (k) e 11 (l)) observa-se uma diminuição da intensidade da banda a 3300 cm^{-1} , o que

pode significar uma reação de hidrólise uma vez que os grupos hidroxilos são propensos a esse tipo de reações [102]. Além disso, surgem diversas bandas a 2800-3000 cm^{-1} e 1400-1600 cm^{-1} similares às bandas observadas nos espectros de degradação dos laminados PM face zeína, o que mais uma vez pode ser correlacionado com a degradação da pululana e a exposição da camada interna, neste caso zeína.

Nos espectros da degradação da face papel dos laminados PF com e sem OEE (Figura 11 (o) e 11 (p)), não se verificam alterações uma vez que o tempo de degradação da celulose é superior aos 10 dias do ensaio realizado.

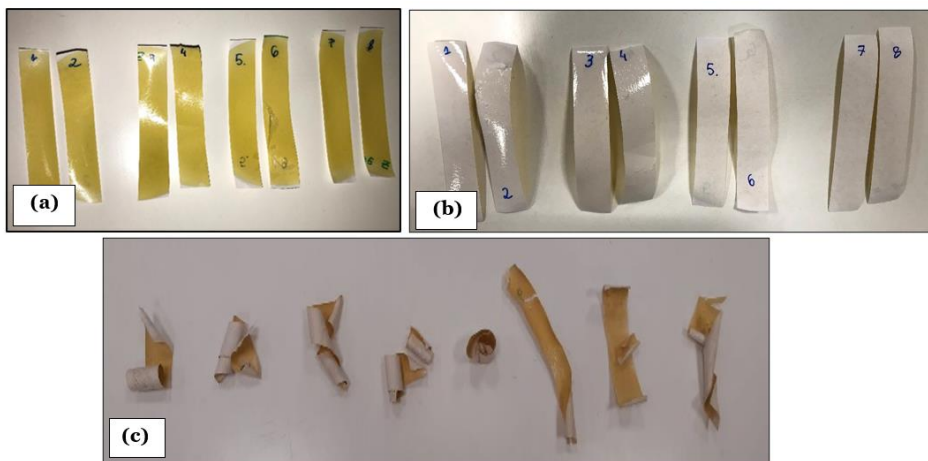


Figura 15 – Amostras dos laminados para o ensaio de biodegradabilidade no dia 0 (a; b), na imagem (a) amostra 1,2 PM sem OEE face zeína, 3,4 PM com OEE face zeína, 5,6 PF sem OEE face pululana, 7,8 PF com OEE, na imagem (b) estão as respectivas outras faces, e a imagem (c) apresenta as mesmas amostras após 10 dias no solo.

Capítulo 6 – Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, produziram-se trilaminados biodegradáveis para embalagem alimentar com potencialidade para substituir as tradicionais embalagens de polímeros sintéticos as quais têm um impacto negativo no meio ambiente.

Inicialmente o objetivo era produzir um trilaminado com a seguinte estrutura: zeína/papel/pululana, sendo que a pululana com o OEE incorporado estaria em contacto com o alimento embalado, o papel contribuiria para melhorar as propriedades mecânicas e a zeína, devido às suas boas propriedades de barreira, estaria na parte exterior da embalagem. No entanto, no decorrer do trabalho pensou-se estudar ainda uma variação dessa estrutura, que seria: papel/zeína/pululana.

A microscopia eletrónica de varrimento permitiu visualizar a microestrutura da secção transversal dos laminados e confirmar a união entre as três camadas. A incorporação do OEE foi confirmada através da calorimetria diferencial de varrimento que demonstrou comportamento térmico diferente entre os laminados com e sem OEE.

Os laminados obtidos apresentaram boas propriedades mecânicas que não foram influenciadas com a incorporação do OEE, com exceção do laminado PF.

Quanto às propriedades óticas, os laminados apresentam uma face amarelada que se deve à zeína e outra branca do papel, a pululana sendo transparente não contribui neste aspeto. Um ponto importante na satisfação do consumidor é a possibilidade de visualizar o alimento embalado, tendo em conta a opacidade do papel, criou-se uma janela, fazendo um corte no papel antes da calandragem, ultrapassando assim esse problema. Com a criação da janela, nessa zona ficou apenas um filme em bicamada de zeína e pululana que permitia a visualização do conteúdo da caixa através da mesma.

O papel (muito poroso) e os filmes de pululana (hidrofílicos) apresentam fracas propriedades de barreira. A ligação destes dois materiais a um filme de zeína melhorou estas propriedades, como se verificou através dos resultados da permeabilidade ao vapor de água.

O estudo da hidrofobicidade da superfície dos laminados demonstrou uma diminuição da hidrofobicidade com a incorporação do OEE, essencialmente na face pululana e, consequentemente aumento da hidrofobicidade através da componente dispersiva da energia de superfície.

A incorporação do OEE nos laminados conferiu-lhes a capacidade de sequestração dos radicais livres DPPH, sendo esta capacidade mais evidente nos laminados PM. A atividade antioxidante dos laminados incorporando o OEE foi ainda avaliada no que respeita à sua capacidade de inibição da peroxidação lipídica, cujos resultados demonstraram a capacidade dos laminados produzidos aumentarem o tempo de prateleira do alimento embalado.

Quanto às propriedades antimicrobianas, observou-se uma melhoria significativa da atividade antimicrobiana dos laminados com a incorporação do OEE, principalmente nas bactérias Gram-positivas.

O modelo alimentar utilizado para testar a eficácia dos laminados como embalagem alimentar demonstrou que o fiambre perdia igualmente peso quando embalado nos laminados e mesmo na embalagem de plástico utilizada como controlo. Apesar do fiambre ter endurecido mais nas caixas de laminados isso não exclui a sua possibilidade de estes serem aplicados como novos materiais de embalagem. Como perspetiva futura, um desafio a superar será a melhoria do processo de produção das caixas dos laminados por forma a ser mais fácil de as selar, garantido assim um ambiente interno mais isolado e seguro para o alimento embalado.

Além disso, durante a produção das caixas dos laminados constatou-se que os laminados PF são muito mais maleáveis do que os laminados PM, a zeína no exterior não facilitou a dobragem. Assim, o papel na composição dos laminados além de contribuir para a melhoria das propriedades mecânicas ajuda também na maneabilidade do material. Após os sete dias de armazenamento do fiambre embalado nas caixas a 4°C, observou-se que as caixas dos laminados PF tinham mantido o seu aspeto inicial apesar de um pouco mais amolecidas, já as caixas dos laminados PM tinham pior aspeto pois ficaram mais pegajosas por fora.

Por fim, testou-se a biodegradabilidade dos laminados, concluindo que ambos os tipos apresentavam elevado nível de degradação em condições de compostagem.

Estes resultados levam a afirmar que os laminados produzidos têm capacidade de substituir os polímeros sintéticos como embalagem alimentar e proporcionar a segurança do alimento. De forma a compreender melhor a estrutura dos laminados e a influência do OEE nessa estrutura poderiam ser realizados ensaios de calorimetria diferencial de varrimento de todos os componentes em separado. Outro aspeto importante seria estudar a libertação do OEE para o alimento utilizando simulantes alimentares. No futuro seria interessante estudar-se o processo de *scale up* da produção destes novos materiais para aplicação a nível industrial e sua introdução no mercado.

Capítulo 7 – Referências bibliográficas

- [1] G. L. Robertson, *History of Food Packaging*. Elsevier Inc., 2019.
- [2] I. Kuijt, “What Do We Really Know about Food Storage, Surplus, and Feasting in Preagricultural Communities?,” in *Current Anthropology*, vol. 50, no. 5, 2009, pp. 641–644.
- [3] B. Ottoni, R. M. Deus, R. Aparecida, G. Battistelle, J. Alcides, and G. Júnior, “Embalagens e Comunicação: relações conceituais,” *Integr. Eng.*, 2020.
- [4] S. Rangappa, J. Parameswaranpillai, S. Thiagamani, S. Krishnasamy, and S. Siengchin, *Food Packaging: Advanced Materials, Technologies, and Innovations*, 1st ed. CRC Press, 2020.
- [5] G. L. Robertson, *Food Packaging: Principles and Practice*. CRC Press, 2013.
- [6] G. L. Robertson, “Food Packaging,” in *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, vol. 3, Elsevier Inc., 2014, pp. 232–249.
- [7] D. Dainelli, N. Gontard, D. Spyropoulos, E. Zondervan-van den Beuken, and P. Tobback, “Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 19, pp. S103–S112, 2008.
- [8] M. Stoica, V. Marian Antohi, M. Laura Zlati, and D. Stoica, “The financial impact of replacing plastic packaging by biodegradable biopolymers - A smart solution for the food industry,” *J. Clean. Prod.*, vol. 277, p. 124013, 2020.
- [9] K. Critchell *et al.*, “Plastic Pollution in the Coastal Environment: Current Challenges and Future Solutions,” in *Coasts and Estuaries: The Future*, Elsevier Inc., 2019, pp. 595–609.
- [10] C. Matthews, F. Moran, and A. K. Jaiswal, “A Review on European Union’s Strategy for plastics in a circular economy and its impact on food safety,” *J. Clean. Prod.*, vol. 283, p. 125263, 2020.
- [11] L. Brennan *et al.*, “The role of packaging in fighting food waste: A systematised review of consumer perceptions of packaging,” *J. Clean. Prod.*, vol. 281, p. 125276, 2021.
- [12] L. M. D. Barcelos, “O impacto dos plásticos nos oceanos,” *Pingo Lava*, vol. 40, pp. 43–46, 2016.
- [13] A. Ferreira, V. Alves, and I. Coelho, “Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications,” *Membranes (Basel)*, vol. 6, no. 22, p. 17, 2016.
- [14] W. C. LI, H. F. TSE, and L. FOK, “Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects,” *Sci. Total Environ.*, vol. 566–567, pp. 333–349, 2016.

- [15] A. Ragusa *et al.*, “Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta,” *Environ. Int.*, vol. 146, p. 106274, 2021.
- [16] P. Europe and EPRO, “Plastics - the Facts 2019,” 2019, [Online]. Available: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>.
- [17] E. Comission, “Report from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions on the Implementation of the Circular Economy Action Plan.,” no. 2010, 2020.
- [18] A. Trajkovska, D. Daniloski, N. M. D. Cunha, N. Naumovski, and A. T. Broach, “Edible packaging : Sustainable solutions and novel trends in food packaging,” *Food Res. Int.*, vol. 140, p. 109981, 2021.
- [19] I. Majid, G. A. Nayik, S. M. Dar, and V. Nanda, “Novel food packaging technologies : Innovations and future prospective,” *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 454–462, 2016.
- [20] Domingos Almeida, “Manuseamento de produtos hortofrutícolas,” *SPI Sociedade Portuguesa de Inovação*, 2008.
- [21] J. B. Kuswandi, “Active and intelligent packaging, safety, and quality controls,” in *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Technologies and Mechanisms for Safety Control*, Elsevier Inc., 2020, pp. 243–294.
- [22] C. N. Cutter, “Microbial Control by Packaging: A Review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 42, no. 2, pp. 151–161, 2002.
- [23] S. Sharma, S. Barkauskaite, A. K. Jaiswal, and S. Jaiswal, “Essential oils as additives in active food packaging,” *Food Chem.*, vol. 343, p. 128403, 2021.
- [24] S. Yildirim *et al.*, “Active Packaging Applications for Food,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 17, no. 1, pp. 165–199, 2018.
- [25] C. Vilela *et al.*, “A concise guide to active agents for active food packaging,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 80, pp. 212–222, 2018.
- [26] A. Mousavi Khaneghah, S. M. B. Hashemi, and S. Limbo, “Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 111, pp. 1–19, 2018.
- [27] Â. Silva, A. Duarte, S. Sousa, A. Ramos, and F. C. Domingues, “Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives films incorporated with a resveratrol inclusion complex,” *LWT*, vol. 73, pp. 481–489, 2016.
- [28] Â. Luís, L. Pereira, F. Domingues, and A. Ramos, “Development of a carboxymethyl xylan film containing licorice essential oil with antioxidant properties to inhibit the growth of foodborne pathogens,” *LWT*, vol. 111, pp. 218–225, 2019.
- [29] P. Ezati and J. W. Rhim, “pH-responsive pectin-based multifunctional films

- incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 230, p. 115638, 2020.
- [30] A. Nestic, C. Castillo, P. Castaño, G. Cabrera-Barjas, and J. Serrano, “Bio-based packaging materials,” in *Biobased Products and Industries*, Elsevier, 2020, pp. 279–309.
- [31] S. Sivakanthan, S. Rajendran, A. Gamage, and T. Madhujith, “Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers : A review,” *Food Res. Int.*, vol. 136, p. 109327, 2020.
- [32] R. Rebelo, M. Fernandes, and R. Figueiro, “Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review,” *Procedia Eng.*, vol. 200, pp. 236–243, 2017.
- [33] T. Saha, E. Hoque, and T. Mahbub, “Biopolymers for Sustainable Packaging in Food , Cosmetics , and Pharmaceuticals,” in *Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-based Polymers*, Elsevier Inc., 2020, pp. 197–214.
- [34] S. Majhi, A. Tyagi, and A. Mishra, “Bio-Polymeric Packaging Material for Packaging of Raw Food,” in *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*, Elsevier, 2020, pp. 44–51.
- [35] S. A. A. Mohamed, E. Mohamed, and A. E.-S. Mohamed, “Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 238, p. 116178.
- [36] B. Regubalan, P. Pandit, S. Maiti, and G. T. Nadathur, “Potential Bio-Based Edible Films , Foams , and Hydrogels for Food Packaging,” *Bio-based Mater. Food Packag.*, pp. 105–123, 2018.
- [37] J. W. Rhim, H. M. Park, and C. S. Ha, “Bio-nanocomposites for food packaging applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, pp. 1629–1652, 2013.
- [38] S. García-Lara and S. O. Serna-Saldivar, “Corn History and Culture,” in *Corn*, Elsevier, 2019, pp. 1–18.
- [39] Í. da S. Papalia and P. M. G. Londero, “Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos,” *Tecnol. Aliment.*, vol. 45, pp. 552–559, 2015.
- [40] İ. Arcan, D. Boyacı, and A. Yemenicioğlu, “The Use of Zein and Its Edible Films for the Development of Food Packaging Materials,” *Ref. Modul. Food Sci.*, pp. 1–11, 2017.
- [41] H. Xu, Y. Chai, and G. Zhang, “Synergistic Effect of Oleic Acid and Glycerol on Zein Film Plasticization,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 10075–10081, 2012.
- [42] M. R. Kasaai, “Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications : A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, pp. 184–197, 2018.
- [43] J. W. Lawton, “Zein: A History of Processing and Use,” *Cereal Chem. J.*, vol. 79, pp. 1–18, 2002.
- [44] B. A. Larkins, “Proteins of the Kernel,” in *Corn*, 3rd ed., Elsevier, 2019, pp. 319–336.

- [45] Y. Luo and Q. Wang, "Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 40696, pp. 1–12, 2014.
- [46] Â. Luís, F. Domingues, and A. Ramos, "Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties," *Microorganisms*, vol. 7, no. 267, pp. 1–17, 2019.
- [47] S. Li, L. Huang, B. Zhang, C. Chen, X. Fu, and Q. Huang, "Fabrication and characterization of starch/zein nanocomposites with pH-responsive emulsion behavior," *Food Hydrocoll.*, vol. 112, p. 106341, 2021.
- [48] L. C. Dickey, N. Parris, J. C. Craig, and M. J. Kurantz, "Ethanol extraction of zein from maize," *Ind. Crops Prod.*, vol. 13, pp. 67–76, 2001.
- [49] Y. Zhang *et al.*, "Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape," *J. Control. Release*, vol. 206, pp. 206–219, 2015.
- [50] S. Qian *et al.*, "Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products," *PLoS One*, vol. 13, no. 12, p. 11, 2018.
- [51] M. Asgher, S. A. Qamar, M. Bilal, and H. M. N. Iqbal, "Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials," *Food Res. Int.*, vol. 137, p. 109625, 2020.
- [52] V. Müller, J. F. Piai, A. R. Fajardo, S. L. Fávaro, A. F. Rubira, and E. C. Muniz, "Preparation and Characterization of Zein and Zein-Chitosan Microspheres with Great Prospective of Application in Controlled Drug Release," *J. Nanomater.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [53] V. D. Prajapati, G. K. Jani, and S. M. Khanda, "Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 95, no. 1, pp. 540–549, 2013.
- [54] Â. Luís, A. Ramos, and F. Domingues, "Pullulan Films Containing Rockrose Essential Oil for Potential Food Packaging Applications," *Antibiotics*, vol. 9, no. 10, p. 681, 2020.
- [55] B. Niu, P. Shao, H. Chen, and P. Sun, "Structural and physicochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 208, pp. 276–284, 2019.
- [56] R. S. Singh, N. Kaur, and J. F. Kennedy, "Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 217, pp. 46–57, 2019.
- [57] T. Danjo, Y. Enomoto, H. Shimada, S. Nobukawa, M. Yamaguchi, and T. Iwata, "Zero birefringence films of pullulan ester derivatives," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 46342, 2017.
- [58] Y. Chu *et al.*, "Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 122, pp. 388–394, 2019.

- [59] K. Han, Y. Liu, Y. Liu, X. Huang, and L. Sheng, "Characterization and film-forming mechanism of egg white/pullulan blend film," *Food Chem.*, vol. 315, p. 126201, 2020.
- [60] Â. Luís, E. Gallardo, A. Ramos, and F. Domingues, "Design and Characterization of Bioactive Bilayer Films: Release Kinetics of Isopropyl Palmitate," *Antibiotics*, vol. 9, no. 8, p. 443, 2020.
- [61] X. Feng, W. Wang, Y. Chu, C. Gao, Q. Liu, and X. Tang, "Effect of cinnamon essential oil nanoemulsion emulsified by OSA modified starch on the structure and properties of pullulan based films," *LWT*, vol. 134, p. 110123, 2020.
- [62] Y. Chu *et al.*, "Fabrication, structure and properties of pullulan-based active films incorporated with ultrasound-assisted cinnamon essential oil nanoemulsions," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 25, p. 100547, 2020.
- [63] Y. Chu *et al.*, "Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion," *Lwt*, vol. 122, p. 109054, 2020.
- [64] N. Bhargava, V. Singh, R. S. Mor, and K. Kumar, "Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived bioactive compounds : A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 105, pp. 385–401, 2020.
- [65] D. F. Frazão, J. R. Raimundo, J. L. Domingues, C. Quintela-Sabarís, J. C. Gonçalves, and F. Delgado, "*Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems," *Planta*, vol. 247, no. 2, pp. 289–300, 2018.
- [66] E. Barrañón-Catalán *et al.*, "Rockroses (*Cistus* sp.) Oils," in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Academic Press, 2016, pp. 649–658.
- [67] C. S. Tavares *et al.*, "Bioproducts from forest biomass: Essential oils and hydrolates from wastes of *Cupressus lusitanica* Mill. and *Cistus ladanifer* L.," *Ind. Crops Prod.*, vol. 144, p. 112034, 2020.
- [68] J. R. Raimundo *et al.*, "Neglected Mediterranean plant species are valuable resources: the example of *Cistus ladanifer*," *Planta*, vol. 248, no. 6, pp. 1351–1364, 2018.
- [69] G. Mensitieri *et al.*, "Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 22, no. 2–3, pp. 72–80, 2011.
- [70] G. Prabu, S. Muthusamy, B. Selvaganesh, N. Sivakumar, A. Hosseini-bandegharai, and P. Loke, "Biopolymers and composites : Properties , characterization and their applications in food , medical and pharmaceutical industries," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 4, p. 105322, 2021.
- [71] A. Ramos, S. Sousa, D. V. Evtuguin, and J. A. F. Gamelas, "Functionalized xylans in the production of xylan-coated paper laminates," *React. Funct. Polym.*, vol. 117, pp. 89–96, 2017.

- [72] B. Hassan, S. A. S. Chatha, A. I. Hussain, K. M. Zia, and N. Akhtar, "Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 1095–1107, 2018.
- [73] S. Tabasum *et al.*, "A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 603–632, 2018.
- [74] H. Wang, F. Ding, L. Ma, and Y. Zhang, "Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application," *Food Biosci.*, vol. 40, p. 100871, 2021.
- [75] S. R. Djafari Petroudy, "Physical and mechanical properties of natural fibers," in *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction*, Elsevier Ltd, 2017, pp. 59–83.
- [76] A. Joshi and V. Bhanot, "Effect of accelerated aging on the tensile index of a synthetic insulation paper," *NDT E Int.*, vol. 38, no. 5, pp. 394–396, 2005.
- [77] D. R. H. Jones and M. F. Ashby, "Elastic Moduli," in *Engineering Materials 1*, 5th ed., 2019, pp. 31–47.
- [78] A. Rudawska and E. Jacniacka, "Analysis for determining surface free energy uncertainty by the Owen – Wendt method," *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 29, pp. 451–457, 2008,
- [79] C. Wang, G. O. Brown, D. L. Burris, L. T. J. Korley, and T. H. Epps, "Coating Architects: Manipulating Multiscale Structures To Optimize Interfacial Properties for Coating Applications," *ACS Appl. Polym. Mater.*, vol. 1, no. 9, pp. 2249–2266, 2019.
- [80] "What is Surface Energy? Calculation Models and More Explained | Ossila." <https://www.ossila.com/pages/a-guide-to-surface-energy> (accessed May 03, 2021).
- [81] M. Kashiri *et al.*, "Zein films and coatings as carriers and release systems of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging," *Food Hydrocoll.*, vol. 70, pp. 260–268, 2017.
- [82] K. Mueller, C. Schoenweitz, and H. Langowski, "Thin Laminate Films for Barrier Packaging Application - Influence of Down Gauging and Substrate Surface Properties on the Permeation Properties," *Packag. Technol. Sci.*, vol. 25, no. 3, pp. 137–148, 2012.
- [83] "DPPH Assay - an overview | ScienceDirect Topics." <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/dpph-assay> (accessed Jun. 08, 2021).
- [84] X. Chen, L. Liang, and C. Han, "Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay," *LWT*, vol. 131, p. 109769, 2020.
- [85] A. L. Dawidowicz and M. Olszowy, "Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -carotene bleaching

- assay: Experiments with BHT used as standard antioxidant,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 231, no. 6, pp. 835–840, 2010.
- [86] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016.
- [87] Herdade de Vale do Côvo, “Os perfumes da Nossa Terra.” 2016.
- [88] Â. Luís, A. Ramos, and F. Domingues, “Pullulan–Apple Fiber Biocomposite Films: Optical, Mechanical, Barrier, Antioxidant and Antibacterial Properties,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 6, p. 870, 2021.
- [89] A. O. Küçüközet and M. K. Uslu, “Cooking loss, tenderness, and sensory evaluation of chicken meat roasted after wrapping with edible films,” *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 24, no. 7, pp. 576–584, 2018.
- [90] L. Chen and U. L. Opara, “Texture measurement approaches in fresh and processed foods - A review,” *Food Res. Int.*, vol. 51, no. 2, pp. 823–835, 2013.
- [91] “Scanning Electron Microscopy - an overview | ScienceDirect Topics.” <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/scanning-electron-microscopy> (accessed May 12, 2021).
- [92] M. Pinto, “Desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar,” Dissertação de Mestrado, UBI, 2020.
- [93] Y. Miao, R. Yang, D. Y. B. Deng, and L. M. Zhang, “Poly(L-lysine) modified zein nanofibrous membranes as efficient scaffold for adhesion, proliferation, and differentiation of neural stem cells,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 29, pp. 17711–17719, 2017.
- [94] V. Hospodarova, E. Singovszka, and N. Stevulova, “Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials,” *Am. J. Anal. Chem.*, vol. 09, no. 06, pp. 303–310, 2018.
- [95] M. Hassannia-Kolae, F. Khodaiyan, R. Pourahmad, and I. Shahabi-Ghahfarrokhi, “Development of ecofriendly bionanocomposite: Whey protein isolate/pullulan films with nano-SiO₂,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 86, pp. 139–144, 2016.
- [96] L. Szcześniak, A. Rachocki, and J. Tritt-Goc, “Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder,” *Cellulose*, vol. 15, no. 3, pp. 445–451, 2008.
- [97] H. Sun, X. Shao, R. Jiang, Z. Shen, and Z. Ma, “Mechanical and barrier properties of corn distarch phosphate-zein bilayer films by thermocompression,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, pp. 2076–2081, 2018.
- [98] Q. Yan, H. Hou, P. Guo, and H. Dong, “Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 707–712, 2012.
- [99] G. Chen, B. Zhang, J. Zhao, and H. Chen, “Development and characterization of food

- packaging film from cellulose sulfate,” *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 476–483, 2014.
- [100] R. Domínguez *et al.*, “Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry : A review,” *Food Res. Int.*, vol. 113, pp. 93–101, 2018.
- [101] S. Sahraee, J. M. Milani, J. M. Regenstein, and H. S. Kafil, “Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review,” *Food Biosci.*, vol. 32, p. 100451, 2019.
- [102] E. Kabir, R. Kaur, J. Lee, K. H. Kim, and E. E. Kwon, “Prospects of biopolymer technology as an alternative option for non-degradable plastics and sustainable management of plastic wastes,” *J. Clean. Prod.*, vol. 258, p. 120536, 2020.

Anexo

Resumo aceite para comunicação em painel ao congresso RRB 2021 - International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, 6 a 8 de Setembro de 2021, Universidade de Aveiro, Portugal.

Development of pullulan/cellulose/zein trilaminates for active food packaging

Mariya Bilohan¹, A. Ramos², F. Domingues¹, [Á. Luís¹](#)

¹Health Sciences Research Centre (CICS-UBI), University of Beira Interior, Covilhã, Portugal; ²Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit (FibEnTech), University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

afluis27@gmail.com

The growing concern with sustainability has driven the development of food packaging based on biopolymers from renewable sources. Active food packaging extends food shelf-life and maintains food safety. Biopolymers used to design this type of packaging have the potential to replace synthetic polymers and are environmentally friendly due to their biodegradability. Several biopolymers are obtained from the reuse of biomass from food industry waste, contributing also to the circular economy. However, when compared to synthetic polymers, biopolymers have weaker mechanical and barrier properties. Thus, the objective of this work was to produce a trilaminate for active food packaging bringing together the advantages of each individual biopolymer and incorporating rockrose (*Cistus ladanifer*) essential oil in its composition, ascribing antimicrobial, and antioxidant properties. Pullulan is a polysaccharide produced extracellularly by *Aureobasidium/pullulans* that can use agro-industrial by-products as a nutritional source. Zein is a hydrophobic protein obtained during processing of corn starch. Both biopolymers are generally recognized as safe (GRAS). In this work, individual zein and pullulan films, prepared by solvent evaporation, were applied on paper by a calendering molding technique under previously established temperature and pressure conditions. Two types of trilaminates were developed and characterized: pullulan/cellulose/zein (PCZ) and pullulan/zein/cellulose (PZC). The cellulose function is to improve the mechanical properties, zein contributes with great barrier properties, and pullulan with the essential oil incorporated attributes antimicrobial and antioxidant properties. The obtained trilaminates showed an improvement in mechanical properties, particularly in elongation at break, when compared to the individual films. Higher antimicrobial activity of both types of trilaminates was observed on Gram-positive bacteria, whereas on Gram-negative bacteria only the PCZ trilaminates presented contact inhibition activity. Both trilaminates shown to have antioxidant activity, which allows the use of these materials in packaging to prevent oxidation and food rancidity. Finally, the trilaminates were applied in a food model developed with fresh ham, being found that the final appearance of the samples had improved in packages made with PZC trilaminates, which were also easier to handle in this type of trilaminate. Thus, a promising packaging material with the potential to be not only sustainable but also safe and beneficial to humans was obtained.